

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT

**REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA ENZIMA
NITROGENASE EM *Azospirillum brasilense***

CURITIBA

2012

EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT

**REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA ENZIMA
NITROGENASE EM *Azospirillum brasilense***

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

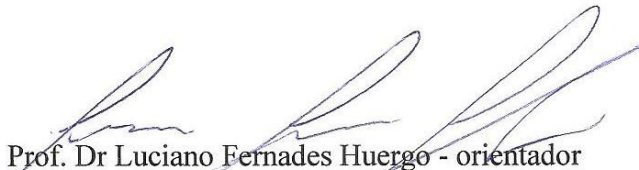
Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2012

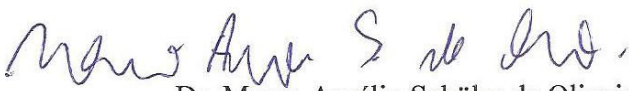
TERMO DE APROVAÇÃO**EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



Prof. Dr Luciano Fernandes Huergo - orientador

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr. Marco Aurélio Schüler de Oliveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr. Gisele Klassen

Departamento de Patologia Básica - UFPR

Curitiba, 13 de fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por nunca me deixar vacilar, mesmo quando as coisas parecem impossíveis de se resolver.

Agradeço ao Dr. Luciano F. Huergo pela orientação, ensinamentos e todo o tempo dedicado a mim nesse período de mestrado, estando sempre acessível para dúvidas e discussões, e sendo imensamente compreensível em todos os momentos.

Ao Dr. Marcelo Müller dos Santos, pela co-orientação e por toda a ajuda e tempo dedicado a mim no decorrer desta tese.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza por me aceitar e incentivar, inicialmente.

Ao Dr. Marcos Luiz Pessatti, por ser meu primeiro modelo e incentivador na bioquímica e pela amizade no decorrer destes anos.

A todos os professores e demais integrantes do Núcleo de fixação de Nitrogênio pela ajuda, discussões, dicas, e convívio.

Ao Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira e a Ms. Vivian R. Moure por toda ajuda oferecida.

Aos amigos da 271 e 272 pelo ótimo convívio, em especial à Dr. Luíza Maria de Araújo, Thiago Estefano Rodrigues, Patrícia Sotomaior, Marcelo Scardueli, Agnaldo Rocha e Mayra Feldato, por toda a ajuda prestada.

À coordenação do curso de pós-graduação em bioquímica e aos professores do departamento Bioquímica. A CAPES, ao CNPq, ao programa PRONEX e a FUNPAR pelo suporte financeiro.

Aos técnicos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio Valter de Baura e Roseli Prado por toda a ajuda oferecida no decorrer da minha tese.

Ao meu marido, Roberto Drebes Gerhardt, por todo o amor, por ser tão companheiro e compreensível, por me apoiar incondicionalmente e acreditar tanto em mim e à minha mãe Neuza Castro Marques e às minhas irmãs Edilaine C. Marques e Eduarda C. Marques, por todo o amor, carinho, fé em mim e por serem os alicerces da minha vida. Vocês são o que há de mais importante na minha vida.

Ao meu pai Edison Marques (em memória), por seu amor incondicional por mim.

À minha família como um todo, por todo o apoio e confiança na minha capacidade.

Aos amigos do mestrado e aos meus amigos de toda a vida, em especial Heloísa B. Soligo, Carlos Eduardo Sanchuki, Gisele Dagnoni Notari, Sabrina Schumacker Zanca, Paulo Henrique da Silva, Amanda C. Verussa, Joycemara Casalvara e Sandra Damásio, pela presença (mesmo que a distância) tão marcante na minha vida. Vocês fazem a minha vida mais bonita.

RESUMO

Azospirillum brasilense é um organismo diazotrófico com capacidade de se associar com diversas plantas de interesse econômico. Devido ao custo energético do processo de fixação de nitrogênio, esse processo é altamente regulado a níveis transcricionais e pós-traducionais. Em *A. brasilense*, a regulação pós-traducional da nitrogenase é realizada pelas enzimas DraG e DraT, que promovem a remoção/adição de um grupo ADP-ribose à proteína NifH, levando ao ligamento/desligamento da mesma. As proteínas PII são proteínas transdutoras de sinais, ubíquas em bactérias. Elas estão envolvidas com a regulação do metabolismo de nitrogênio e atuam principalmente por interação direta com proteínas alvo. Em *A. brasilense* existem duas proteínas PII denominadas GlnB e GlnZ, que interagem com DraT e DraG, respectivamente, regulando-as. Além disso, proteínas PII podem interagir ainda com a proteína de membrana AmtB em resposta a alteração dos níveis celulares de amônio, que leva a alteração nos níveis intracelulares dos efetores ADP, ATP e 2-OG. Em resposta a essa alteração, GlnZ, DraG e AmtB podem interagir formando um complexo ternário por intermédio de GlnZ. As proteínas PII de *A. brasilense* apresentam alta similaridade entre si, mas são altamente específicas para suas proteínas alvo, embora as bases estruturais para essa especificidade não sejam bem conhecidas. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi determinar motivos estruturais nas proteínas PII responsáveis pela especificidade na interação com as enzimas DraT e DraG em *Azospirillum brasilense* e investigar como alterações nos níveis celulares de 2-OG e energia influenciam a atividade das proteínas PII neste organismo. DraG, diferentemente das demais proteínas alvo de PII, interage com GlnZ pela região lateral dos trímeros e a especificidade da interação DraG-GlnZ se dá pelos resíduos D68, Q69, Q72, T21 e L23 de GlnZ. A formação dos complexos DraG-GlnZ e AmtB-PII parece ser regulada principalmente pela concentração de 2-OG, que controla a ocupação dos sítios de ligação de efetores por ADP ou ATP. Quando na presença de ADP, DraG, GlnZ e AmtB podem formar um complexo ternário que parece ser o responsável *in vivo* pela inativação do substrato, mas *in vitro*, a enzima DraG permanece enzimaticamente ativa mesmo quando complexada a GlnZ ou GlnZ-AmtB, indicando que o complexo não é suficientemente estável para impedir a catálise (remoção ADPR de NifH) e reforçando a hipótese de que o sequestro de DraG para membrana é necessária para inativação de DraG.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a diazotrophic organism with the ability to associate with many plants of economic interest. Due to the energetic cost of nitrogen fixation process, this process is highly regulated at the transcriptional and post-translational levels. In *A. brasilense*, nitrogenase posttranslational regulation is performed by DraG and DraT, which remove/adds a ADP-ribose to NifH protein, leading to switch on/switch off of NifH. PII proteins are signal transducing proteins, ubiquitous in bacteria. They are involved in the regulation of nitrogen metabolism and act primarily by direct interaction with target proteins. In *A. brasilense* two PII proteins were indentified, GlnB and GlnZ, that interact with DraT and DraG, respectively, regulating DraT and DraG activities. Furthermore, proteins PII can interact with the membrane protein AmtB in response to variation in cellular levels of ammonium that, in turn, affect the intracellular levels of the PII effectors ADP, ATP and 2-OG. In response to ammonium, GlnZ, DraG and AmtB interact to form a ternary complex. Despite their high similarity, PII proteins from *A. brasilense* are highly specific for interaction with their target proteins. The structural basis for such specificity is unknown. The objectives of this study were to determine structural motifs responsible for the ability PII to interact specifically with DraT and DraG in *Azospirillum brasilense* and also to investigate how changes in the cellular levels of 2-OG and energy can influence the activity of PII proteins in this organism. DraG interacts with GlnZ by the lateral region of the trimer and the specificity of the interaction DraG-GlnZ occurs by residues D68, Q69, Q72, T21 and L23 of GlnZ. The formation of the complexes DraG-GlnZ and AmtB-PII are regulated mainly by the concentration of 2-OG, which controls the occupation of PII proteins by ADP or ATP. In the presence of ADP, DraG, GlnZ and AmtB form a ternary complex that seems to be responsible for DraG inactivation *in vivo*, however, *in vitro*, DraG remains enzymatically active even when complexed the GlnZ or GlnZ-AmtB, indicating that the complex is not stable enough to prevent catalysis (removal of ADPR NifH) and supports the hypothesis that the sequestration of DraG to membrane is required for inactivation of DraG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da inativação reversível de NifH por ADP-ribosilação.....	19
Figura 2 - Representação da estrutura do trímero de GlnZ	22
Figura 3 – Alinhamento (clustal W) das proteínas GlnZ e GlnB de <i>A. brasilense</i>	24
Figura 4 – Representação do complexo AmtB-GlnK de <i>E. coli</i>	27
Figura 5 – Modelo para regulação das atividades das enzimas DraT e DraG em resposta a adição de amônio em <i>A. brasilense</i>	29
Figura 6 – Estrutura da proteína DraG quando ligada ou não ligada a GlnZ.	29
Figura 7 – Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação de proteína GlnZ mutante.....	59
Figura 8 – Perfil eletroforético das frações contendo as proteínas purificadas após diálise.	60
Figura 9 – Perfil eletroforético das proteínas mutantes PII em gel nativo..	61
Figura 10 – Representação da interface DraG-GlnZ. Sobreposição de GlnZ-ADP (vermelho) e GlnZ MgATP 2-oxoglutarate (azul) de <i>A. brasilense</i>	63
Figura 11 – Ensaio de interação (co-precipitação) DraG-PII.	64
Figura 12 – Ensaio de interação (co-precipitação) AmtB-PII.	65
Figura 13 – Estrutura do complexo DraG-GlnZ.....	66
Figura 14 – Interações detalhadas entre GlnZ e DraG.	67
Figura 15 – Representação do complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG.	68
Figura 16 – Ensaio de Interação (co-precipitação) DraT-PII.	71
Figura 17 – Ensaio de interação da proteína DraT com GlnB, GlnB Δ 42-54 e diferentes proporções do heterotrímero GlnB:GlnB Δ 42-54.	72
Figura 18 – Modelo da ligação de NifH ADP-ribosilada à DraG de <i>A. brasilense</i>	73
Figura 19 – Ensaio de atividade da enzima DraG utilizando DAAR como substrato. ...	74
Figura 20 – Ensaio de atividade da enzima DraG in vitro com substrato análogo DAAR.	75
Figura 21 – Purificação parcial da proteína NifH ADP-ribosilada.....	78
Figura 22 – Ensaio de atividade da proteína DraG in vitro com NifH-ADPR como substrato.	79
Figura 23 – Ensaio de atividade in vitro da proteína DraG + GlnZ ou DraG + GlnZ Δ 42-54 com NifH como substrato.	80
Figura 24 – Perfil de Uridililação das proteínas mutantes PII.	82
Figura 25 – Papel do resíduo Q39 na uridililação de GlnZ.....	83
Figura 26 – Efeito de diferentes proporções ATP/ADP e diferentes concentrações de 2-OG na interação DraG/GlnZ..	85
Figura 27 – Efeito de diferentes proporções ATP/ADP e diferentes concentrações de 2OG na interação AmtB/PII.	87
Figura 28 – Sítio de ligação a 2-OG em GlnZ de <i>A. brasilense</i>	88
Figura 29 – Efeito de diferentes metais na interação DraG/GlnZ.	90
Figura 30 – Curvas padrões para ADP, ADP, 2-OG, Glutamina e Glutamato em análise LC-MS em modo negativo.....	92
Figura 31 – Sobreposição de cromatogramas de íons de metabólitos selecionados em extratos de <i>A. brasilense</i>	93
Figura 32 – Dosagem de metabólitos intracelulares em <i>A. brasilense</i> em condição de fixação de nitrogênio.....	96
Figura 33 – Dosagem de metabólitos intracelulares em <i>A. brasilense</i> em condição de não-fixação de nitrogênio	98
Figura 34 – Perfil de modificação das proteínas NifH e GS após choque de amônio na estirpe selvagem <i>A. brasilense</i> FP2.	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS.....	33
TABELA 2 – PLASMÍDEOS.....	33
TABELA 3 - PLASMÍDEO UTILIZADO COMO MOLDE E PRIMERS MUTAGÊNICOS USADOS.....	38
TABELA 4 – ANTICORPOS E DILUIÇÕES.....	48
TABELA 5 – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS PROTEÍNAS PII PURIFICADAS	58
TABELA 6 – MASSA MONOISOTÓPICA, TEMPO DE RETENÇÃO E ERRO OBSERVADOS PARA DEZ METABÓLITOS DE <i>A. BRASILENSE</i> ANALISADOS POR LC/MS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-oxoglutarato
ADP	5' difosfato de adenosina
AMP	5' monofosfato de adenosina
ATase	enzima adenililtransferase
ATP	5' trifosfato de adenosina
BSA	Albumina bovina
Cm ^r	resistência a cloranfenicol
DO ₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
DAAR	Dansil arginina ADP-ribose
DraG	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	ditiotreitól
e ⁻	elétron
EBP	Proteínas ativadoras de transcrição (<i>enhancer-binding proteins</i>)
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra ético
ESI	Força de ionização
GLN	glutamina
GlnB-UMP	proteína GlnB uridililada
GlnZ-UMP	proteína GlnZ uridililada
GLU	glutamato
GOGAT	glutamato sintase
GS	glutamina sintetase
GS-AMP	proteína GS adenililada
IPTG	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Km ^r	resistência a canamicina
L	litro
LC/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LDAO	Oxido de laurildimetilamina
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption</i>
m/v	massa por volume
N _{2 ase}	nitrogenase
NAD ⁺	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado

NADPH	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NaI ^r	resistência a ácido nalidíxico
NifH-ADPR	proteína NifH-ADP-ribosilada
NtrC-P	proteína NtrC fosforilada
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pi	fosfato inorgânico
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RT	Tempo de retenção
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	dodecilsulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
Sm ^r	resistência a estreptomicina
TBS-T	Tris-salina tamponao e Tween 20
TLC	Cromatografia de camada delgada
TP	tampão
tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade enzimática
UAS	sequência ativadora a montante (<i>upstream activation sequence</i>)
UMP	5' monofosfato de uracila
UR	removedora de uridilil
Utase	enzima uridililtransferase
UV	ultravioleta
v/v	volume por volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1. Azospirillum	13
1.2. Fixação biológica de nitrogênio	14
1.3. Nitrogenase	15
1.4. Genes nif	16
1.5. Regulação Transcricional da Nitrogenase	17
1.6. Regulação pós-traducional da nitrogenase	18
1.6.1. As proteínas DraT e DraG	19
1.7. Proteínas PII em <i>A. brasilense</i>	20
1.8. Proteína AmtB	26
1.9. Papel das proteínas GlnB, GlnZ e AmtB na regulação de DraT e DraG	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Bactérias e Plasmídeos	34
4.2. Meios de Cultura	35
4.3. Antibióticos	37
4.4. Determinação da atividade da nitrogenase	37
4.5. Amplificação de DNA através de PCR	38
4.6. Purificação de DNA plasmideal	38
4.7. Eletroforese de DNA	39
4.8. Reação de Mutagênese	39
4.9. Transformação bacteriana por choque térmico	40
4.9.1. Preparo de células	40
4.9.2. Choque térmico	40
4.10. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes	41
4.11. Expressão das proteínas de interesse	41
4.12. Purificação da proteína His-DraG de <i>A. brasilense</i>	42
4.13. Purificação da proteína His-DraT de <i>A. brasilense</i>	43
4.14. Purificação da proteína His-AmtB de <i>A. brasilense</i>	43
4.15. Purificação da proteína DraG de <i>A. brasilense</i>	44
4.16. Purificação das proteínas GlnZ, GlnB e mutantes PII de <i>A. brasilense</i>	44
4.17. Purificação parcial da proteína NifH de <i>A. brasilense</i>	45
4.18. Dosagem de proteína	46
4.19. Identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS	46
4.20. Interação das proteínas DraG, DraT e AmtB com PII (nativas e mutantes) por ensaio de co-precipitação (<i>pull-down</i>) <i>in vitro</i>	47
4.21. Eletroforese de proteínas sob condições não – desnaturantes	48
4.22. Reação de uridililação da proteína PII de <i>A. brasilense</i>	48
4.23. Western Blot	49

4.24.	Ensaio de atividade de DraG	50
4.25.	Cultivo de célula de <i>A. brasilense</i> selvagem (FP2) para extração de metabólitos e determinação do desligamento-religamento da nitrogenase.....	51
4.26.	Extração dos metabólitos para determinação da concentração intracelular de ADP, ATP, 2-OG, Glutamina e Glutamato.....	52
4.27.	Análise dos metabólitos por LC-MS	53
4.27.1.	Padronização de metabólitos	53
4.27.2.	Cromatografia líquida acoplada a MS – LC-MS	54
4.27.3.	Detecção dos metabólitos por Espectrometria de Massa.....	54
4.27.4.	Análise dos dados obtidos.....	55
4.28.	Dosagem enzimática de 2-OG	55
4.28.1.	Extração de 2-OG	55
4.28.2.	Ensaio Fluorimétrico.....	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1.	Obtenção das proteínas mutantes	57
5.2.	Purificação de proteínas.....	58
5.2.1.	Purificação das proteínas mutantes PII	58
5.2.2.	Análise da conformação das proteínas mutantes através de gel nativo	60
5.3.	Ensaios de interação (co-precipitação) das proteínas PII com DraG-His e AmtB-His	61
5.4.	Interação da proteína His-DraT com proteínas PII nativas e mutantes.....	69
5.5.	Ensaio de atividade da enzima DraG <i>in vitro</i>	72
5.5.1.	Atividade de DraG com DAAR como substrato	73
5.5.2.	Purificação parcial de NifH-ADPR	75
5.5.3.	Atividade <i>in vitro</i> da enzima DraG com NifH ADP-ribosilada como substrato.....	79
5.6.	Ensaio de Uridililação das proteínas PII por GlnD	81
5.7.	Efeito das concentrações de ADP, ATP e 2-OG nas interações DraG-GlnZ e AmtB-PII.....	84
5.8.	Efeito de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} no complexo GlnZ-DraG.....	89
5.9.	Análise de metabólitos em <i>A. brasilense</i> (FP2).....	91
6.	CONCLUSÕES	101
7.	REFERÊNCIAS	102
8.	ANEXO.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos diazotróficos (capazes de fixar nitrogênio atmosférico), aeróbios, sendo encontradas no solo e associadas com raízes de várias plantas como o milho, trigo, sorgo, arroz, banana e abacaxi, em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (DÖBEREINER; DAY, 1976; DÖBEREINER, 1991; GUNARTO *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001).

Azospirillum spp. são bactérias Gram negativas, curvas, móveis e de várias origens geográficas. Este gênero pertence à subdivisão α das Proteobactérias (YOUNG, 1992) e atualmente são descritas quinze espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum*: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (TARRANT *et al.*, 1978), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. irakense* (KHAMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (DEKHIL *et al.*, 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE ; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007a), *A. zae* (MEHNAZ *et al.*, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *A. palatum* (ZHOU *et al.*, 2009), *A. picis* (LIN *et al.*, 2009) e *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010). Entre as várias espécies, *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as mais caracterizadas (BALDANI; BALDANI, 2005). Essas duas espécies tiveram seus genomas recentemente sequenciado (WISNIEWSKI-DYE *et al.*, 2011).

As bactérias do gênero *Azospirillum* têm um grande potencial de uso como biofertilizante, devido à capacidade de colonizar raízes de várias espécies de plantas, sua ampla distribuição geográfica e sua eficiência na fixação de nitrogênio *in vitro* (PEDROSA, 1987). Essas bactérias já foram isoladas de raízes de mais de 100 espécies de plantas, podendo também ser aplicadas em raízes de plantas que não apresentam histórico de colonização com *Azospirillum* (BASHAN *et al.*, 2004). Essas bactérias são potencialmente benéficas para a agricultura, podendo influenciar positivamente o crescimento vegetal, o rendimento da safra e o conteúdo de nitrogênio da planta (STEENHOUDT ; VANDERLEYDEN, 2000).

Em experimentos de inoculação em campo, organismos deste gênero foram capazes de aumentar o rendimento de várias gramíneas economicamente importantes como trigo, sorgo e milho, em solos e regiões climáticas diferentes (PATRIQUIN *et al.*, 1983; OKON ; VANDERLEYDEN, 1997). O uso de inoculantes contendo *Azospirillum* poderia ajudar na redução do uso de fertilizantes químicos diminuindo os custos e a contaminação causada por fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA *et al.*, 2010). Seu uso como biofertilizante já foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para as culturas de milho e trigo.

A inoculação de *A. brasilense* permite a redução de 50% do fertilizante nitrogenado, mantendo a mesma produtividade. Somente no Brasil isto corresponde a cerca de 52 kg de N ha⁻¹ em 14,1 milhões de hectares para o milho e para o trigo, cerca de 35 kg de N ha⁻¹ em 2,4 milhões de ha⁻¹ gerando uma economia de aproximadamente US\$ 1,2 bilhões por ano. Portanto, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* pode contribuir para a meta de reduzir o uso de fertilizantes químicos (HUNGRIA *et al.*, 2010).

1.2. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para a síntese de inúmeras biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos sendo assim fundamental para a manutenção da vida na terra. O gás dinitrogênio, N₂, é a forma mais abundante deste elemento constituindo quase 80% da atmosfera da Terra. Embora a fixação de nitrogênio não seja encontrada em eucariotos (POSTGATE, 1982; TORTORA *et al.*, 1995) vários grupos filogenéticos de procariotos, conhecidas como diazotrofos, conseguem metabolizar o N₂ (DIXON ; KAHN, 2004).

Procariotos podem utilizar diversos compostos como fonte de nitrogênio, desde dinitrogênio a nitrato até compostos complexos como aminoácidos ou nucleosídeos. O amônio, NH₄⁺, é geralmente o composto nitrogenado preferencial por ser de mais fácil utilização em procariotos e proporcionar uma maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas. Porém, em diversas situações, a bactéria é precisa utilizar outras fontes de nitrogênio e para isso, esses

organismos são capazes de sintetizar proteínas envolvidas na captação e metabolização destas fontes alternativas de nitrogênio. Normalmente a síntese e, em alguns casos, a atividade dessas proteínas é altamente regulada em relação à disponibilidade desses compostos (MERRICK ; EDWARDS, 1995).

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio gasoso a amônia, catalisado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase. Esse processo ocorre exclusivamente em procariotos e requer condições ambientais favoráveis. Entre estas, incluem-se ausência de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio, presença de molibdênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Nitrogênio fixado e oxigênio afetam a expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos organismos diazotrofos estudados (POSTGATE, 1982; EADY, 1986). Este processo é parte importante do ciclo do nitrogênio como repositório do conteúdo global de nitrogênio na biosfera.

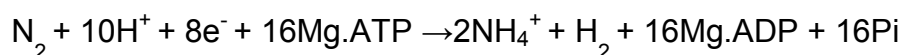
A disponibilidade de nitrogênio fixado é geralmente um fator limitante para a produtividade agrícola, gerando a necessidade de utilização de fertilizantes químicos. As consequências são alteração no ciclo do nitrogênio e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera, acidificação do solo (DIXON ; KAHN, 2004) e vazamento para rios, lagos e aquíferos, gerando eutrofização dessas águas e surgimento de áreas de hipóxia nas costas (CANFIELD *et al.*, 2010). A aplicação de fertilizantes nitrogenados também é um dos processos mais caros na agricultura (PEDROSA, 1987; BHATTACHARJEE *et al.*, 2008). O nitrogênio fornecido pelo processo de fixação biológica é menos propenso a lixiviação e volatilização já que ele é utilizado *in situ*, sendo assim uma alternativa barata, limpa e sustentável para o fornecimento de nitrogênio na agricultura comercial (PEDROSA, 1987).

1.3. Nitrogenase

A nitrogenase é a enzima que catalisa a redução biológica do dinitrogênio a amônia. O complexo da nitrogenase geralmente é composto de duas proteínas: a dinitrogenase redutase, proteína Fe (contém ferro) ou NifH e a dinitrogenase, proteína Fe-Mo (contém ferro e molibdênio) ou NifDK (DEAN ; JACOBSEN, 1992; HOWARD ; REES, 1996; DIXON ; KAHN, 2004). A proteína NifH é um dímero γ_2

(produto do gene *nifH*), contém um núcleo 4Fe-4S e sua função é transportar elétrons até a proteína NifDK que, por sua vez, é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (produto dos genes *nifDK*) contendo dois grupos prostéticos: 2 centros P e 2 cofatores ferro molibdênio (FeMo) (BURRIS, 1991). Os componentes da nitrogenase são extremamente sensíveis ao oxigênio devido a seus grupos metálicos que estão expostos ao solvente.

Esta enzima catalisa a redução do dinitrogênio gasoso (N_2) a amônio como mostra a seguinte reação (EADY, 1986; POSTGATE, 1982):



A nitrogenase desempenha seu papel hidrolisando 16 moléculas de ATP por molécula de N_2 fixada. Em vista do alto gasto energético envolvido na redução do N_2 a NH_3 , o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado tanto na atividade da nitrogenase como na expressão de seus genes (POSTGATE, 1982).

1.4. Genes nif

Os genes *nif* (genes envolvidos com a fixação de nitrogênio) codificam proteínas essenciais para a biossíntese do complexo nitrogenase (MERRICK *et al.*, 1982) e são mais bem estudados em *Klebsiella pneumoniae*. Nesse organismo foram identificados e seqüenciados 20 genes *nif* agrupados em um único *regulon* e distribuídos em 8 *operons* (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVW*, *nifZM*, *nifF*, *nifLA*, e *nifBQ*) (MERRICK, 1988, 1993) sendo que desses 20, pelo menos 14 são essenciais para a biossíntese das proteínas do complexo nitrogenase (MERRICK, 1988). Os genes *nifHDK* são os genes estruturais para o complexo da nitrogenase, enquanto os genes *nifLA* codificam para os reguladores transcricionais dos demais genes *nif*, as proteínas NifL e NifA (MERRICK, 1983, 1988; MERRICK *et al.*, 1982).

Em *A. brasilense* os genes *nif* encontram-se espalhados em regiões distintas do genoma e não de forma agrupada como em *K. pneumoniae*, (PLAZINSKI *et al.*, 1983; SINGH *et al.*, 1989; GALIMAND *et al.*, 1989; PASSAGLIA *et al.*, 1991). Enquanto em *K. pneumoniae* o gene *nifA* faz parte do operon *nifLA*, em *A. brasilense* este gene é monocistrônico e não foi detectado gene ortólogo ao *nifL*

(SINGH *et al.*, 1989; ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996). Em *A. brasilense* a proteína NifA tem sua atividade controlada pelos níveis de amônio e de oxigênio de forma independente de NifL.

1.5. Regulação Transcricional da Nitrogenase

A fixação do nitrogênio é regulada a nível transcricional em resposta aos níveis ambientais de oxigênio e amônia. Uma vez que a nitrogenase apresenta componentes lábeis ao oxigênio, é vantajoso para a bactéria reprimir a transcrição quando os níveis de oxigênio são altos, assim como é vantajoso reprimir esse sistema, que apresenta alto custo energético, quando os níveis celulares de nitrogênio fixado são suficientemente altos (HALBLEIB ; LUDDEN, 2000).

Nas proteobactérias, os genes estruturais da enzima nitrogenase (*nifHDK*) estão sujeitos a ativação da proteína NifA juntamente com o fator σ^{54} da RNA polimerase (DIXON; KHAN, 2004). A proteína NifA pertence à família das EBP's (*enhancer-binding proteins*), envolvida na ativação da transcrição de genes em resposta a estímulos celulares. A NifA se liga a uma região UAS (*Upstream Activation Sequence*) caracterizada pelo motivo TGTN₁₀ACA, no promotor dos genes *nif* localizada a montante do sítio de início da transcrição (BUCK, 1986).

Em muitos diazotrofos estudados, a expressão do gene *nifA* está sob controle do sistema Ntr. Em *K. pneumoniae*, NifA é ativada pela proteína NtrC fosforilada, NifA ativa a transcrição do *regulon nif* incluindo os genes estruturais da nitrogenase *nifHDK* (MERRICK, 1992), e NifA é inibida por NifL na presença de altas concentrações de amônio e oxigênio. O controle da atividade inibitória de NifL sobre a proteína NifA em resposta aos níveis de amônio é mediado pela proteína da família PII, GlnK (JACK *et al.*, 1999). Em *A. brasilense*, a proteína NifL não foi detectada. Neste organismo, NifA é expressa constitutivamente em uma forma inativa, sendo a proteína PII GlnB necessária para sua ativação em condições de fixação de nitrogênio (ARAÚJO *et al.*, 2004; ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996).

1.6. Regulação pós-traducional da nitrogenase

A fim de prevenir a fixação de nitrogênio improdutiva em situações de limitação de energia ou nitrogênio suficiente, vários procariotos fixadores de nitrogênio desenvolveram mecanismos para inativação reversível da nitrogenase quando o ambiente é desfavorável para a fixação de nitrogênio. Estes mecanismos são diversos e incluem (i) modificação covalente de NifH em proteobactérias, (ii) interação das proteínas inibidoras NifL com NifDK em archaea e possivelmente também em outras bactérias anaeróbias, (iii) outros mecanismos desconhecidos que foram relatados em bactérias diazotróficas (HUERGO *et al.*, 2012) e (iv) bloqueio do fluxo de elétrons para nitrogenase (SARKAR *et al.*, 2012).

A regulação pós-traducional da nitrogenase também é conhecida como “switch-off/switch-on” (ZUMFT; CASTILLO, 1978) e é encontrada em diversas bactérias fixadoras de nitrogênio. Em *A. brasilense*, a regulação da nitrogenase se dá por ADP-ribosilação de NifH e é controlada pela presença de amônia no meio externo e pela diminuição da carga energética ocasionada por anaerobiose. A ADP-ribosilação de NifH é catalisada pela enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase) através da transferência de um grupo ADP-ribose do NAD^+ à arginina 101 de uma subunidade do dímero de NifH. A enzima DraG (dinitrogenase redutase glicohidrolase) pode remover o grupo ADP-ribose e restituir a atividade da NifH (HUERGO *et al.*, 2012) (Figura 1). O resíduo de arginina-101 está localizado na face de contato entre NifH e NifDK durante os ciclos de transferência de elétrons necessários para a redução do nitrogênio. A ADP-ribosilação deste resíduo aparentemente impede o contato entre estas proteínas bloqueando a atividade da nitrogenase (SCHINDELIN *et al.*, 1997).

Os genes *draT* e *draG* de *A. brasilense* estão localizados a montante dos genes *nifHDK* e são constitutivamente expressos na orientação contrária dos genes *nif* (FU *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1993). Esses genes são co-transcritos num operon (ZHANG *et al.*, 1992) que também contém o gene *draB* que parece controlar parcialmente a atividade das enzimas DraT e DraG (HALBLEIB *et al.*, 2000).

Comparações de sequências de *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *R. rubrum* e *R. capsulatus* mostraram alta similaridade no operon *draTG* nesses organismos (ZHANG *et al.*, 1997).

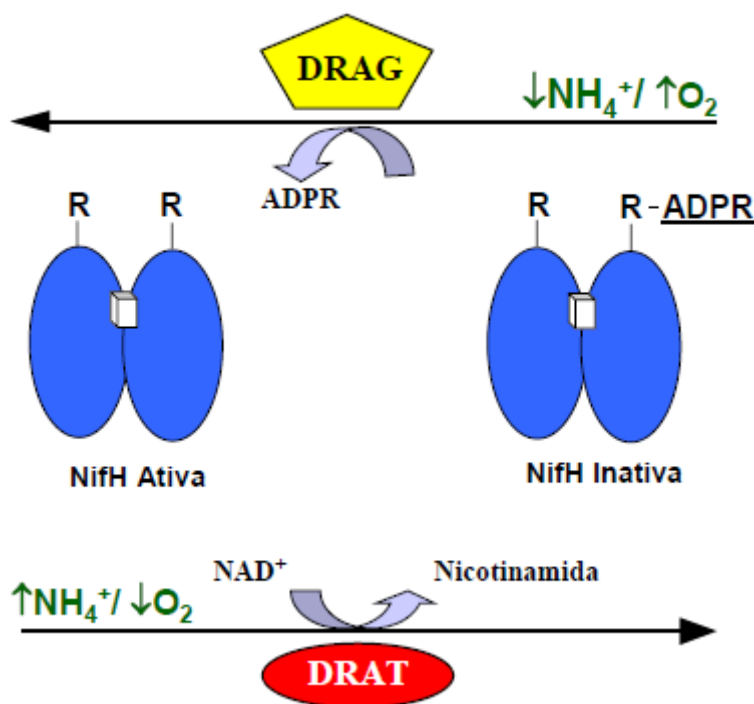


Figura 1 - Esquema da inativação reversível de NifH por ADP-ribosilação. Os dímeros da proteína NifH estão representados em azul, a letra R indica o resíduo de arginina 101, R-ADPR indica o resíduo de Arg101 modificado por ADP-ribose. Fonte: HUERGO, 2006.

1.6.1. As proteínas DraT e DraG

As proteínas DraT e DraG foram primeiramente purificadas e estudadas em *R. rubrum* (SAARI *et al.*, 1984; LOWERY ; LUDDEN, 1988). A proteína DraT desse organismo é monomérica com massa molecular de 30KDa e está presente em baixos níveis dentro da célula, tendo como único substrato conhecido a proteína NifH. A proteína DraT pode utilizar várias moléculas além do NAD^+ como doadores do grupo ADP-ribose (LOWERY e LUDDEN, 1988), sendo incapaz de agir sobre a proteína NifH que foi previamente desnaturada pela exposição ao oxigênio. DraT não é capaz de exercer a remoção do grupo ADP-ribose ou atividade glicohidrolítica (HALBLEIB ; LUDDEN, 2000). Sabe-se ainda que DraT sozinha não é capaz de ligar NAD^+ , sugerindo que o sítio de ligação para NAD^+ seja formado quando DraT e a proteína NifH estão complexadas (GRUNWALD ; LUDDEN, 1997).

A proteína DraG de *R. rubrum* é monomérica, possui massa molecular de 32kDa e apresenta um núcleo de dois manganês (SAARI *et al.*, 1984; NORDLUND, 2000). DraG catalisa a hidrólise da ligação entre o grupo ADP-ribose e a arginina 101 da proteína NifH de *R. rubrum*, esta reação é dependente de Mg-ATP e um cátion divalente como Mn^{2+} e Fe^{2+} (SAARI *et al.*, 1984), sendo ainda capaz de clivar ligações α -N-glicosídica de vários análogos de ADP-ribosilarginina (POPE *et al.*, 1985). A ligação de Mn^{2+} parece ser essencial para a atividade da proteína uma vez que alterações em aminoácidos que levam à perda do núcleo de manganês tornam a proteína inativa (ANTHERAVALLY *et al.*, 2001). A maioria das proteínas com atividade ADP-ribosil hidrolase são dependentes de Mg^{2+} , mas DraG apresenta máxima atividade catalítica na presença de Mn^{2+} , seguido de Fe^{2+} , enquanto concentrações muito altas de Mg^{2+} são necessárias para a obtenção de uma pequena atividade de DraG (BERTHOLD *et al.*, 2009). DraG de *A. brasilense*, assim como a de *R. rubrum*, pode ser ativada *in vitro* por Mg^{2+} , Fe^{2+} e Mn^{2+} , sendo que Mn^{2+} tem sido reportado como mais efetivo *in vitro* (LJUNSGSTRÖM *et al.*, 1989). Em *A. brasilense*, DraG contém 297 aminoácidos distribuídos em 15 α -hélices (H1-H15) com 2 íons Mg^{2+} presentes no sítio ativo e apresenta alta similaridade estrutural com a proteína ADP-ribosilhidrolase de mamíferos (LI *et al.*, 2009).

DraT e DraG apresentam especificidade oposta a MgADP- e MgATP- ligado a NifH, sendo que DraT apresenta maior afinidade à NifH ligada a MgADP- e DraG reconhece como substrato apenas a forma de NifH reduzida ligada a MgATP-. Entretanto, as flutuações dos níveis de ATP e ADP durante o ciclo de inativação/ativação parecem ser insuficientes para uma regulação dramática da nitrogenase (HALBLEIB; LUDDEN, 2000).

1.7. Proteínas PII em *A. brasilense*

As proteínas da família PII possuem um importante papel na coordenação da regulação de processos metabólicos centrais. Elas são amplamente distribuídas em Bacteria, Archaea e cloroplastos de algas vermelhas e plantas de uma forma muito conservada, estando envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio. As proteínas PII são transdutoras de sinais de carbono, nitrogênio e energia, que, na

célula, correspondem à concentração de 2-oxoglutarato (2-OG), glutamina e ATP/ADP, respectivamente. As interações das proteínas do tipo PII com suas moléculas alvo respondem e dependem da variação da concentração destas moléculas (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

As proteínas PII mais estudadas são as proteínas GlnB e GlnK, codificadas pelos genes *glnB* e *glnK*, respectivamente (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). Estes genes foram inicialmente descritos em *E. coli* por Son e Rhee (1987) e por van Heeswijk *et al.* (1996). Proteínas PII já cristalizadas apresentam alta similaridade na estrutura, sendo compactas, homotriméricas com massa de 12-13 kDa por monômero. Cada subunidade apresenta um *loop* exposto ao solvente, denominado *loop* T (figura 2) que é altamente conservado e flexível, sendo vital para a interação das PII com diversos alvos (FORCHHAMMER, 2008; TRUAN, *et al.*, 2010). As subunidades apresentam ainda fendas laterais entre as subunidades, nas quais dois *loops* menores (B e C) contribuem para a formação do sítio de ligação a nucleotídeos onde ADP ou ATP podem se ligar de forma competitiva (TRUAN *et al.*, 2010). Uma característica das proteínas PII em proteobactérias é a capacidade de sofrer modificação pós-traducional reversível por uridililação no resíduo tirosina 51 localizado no *loop* T. Esta modificação é realizada pela enzima bifuncional GlnD (uridililtransferase/removedora de uridilil - UTase/UR).

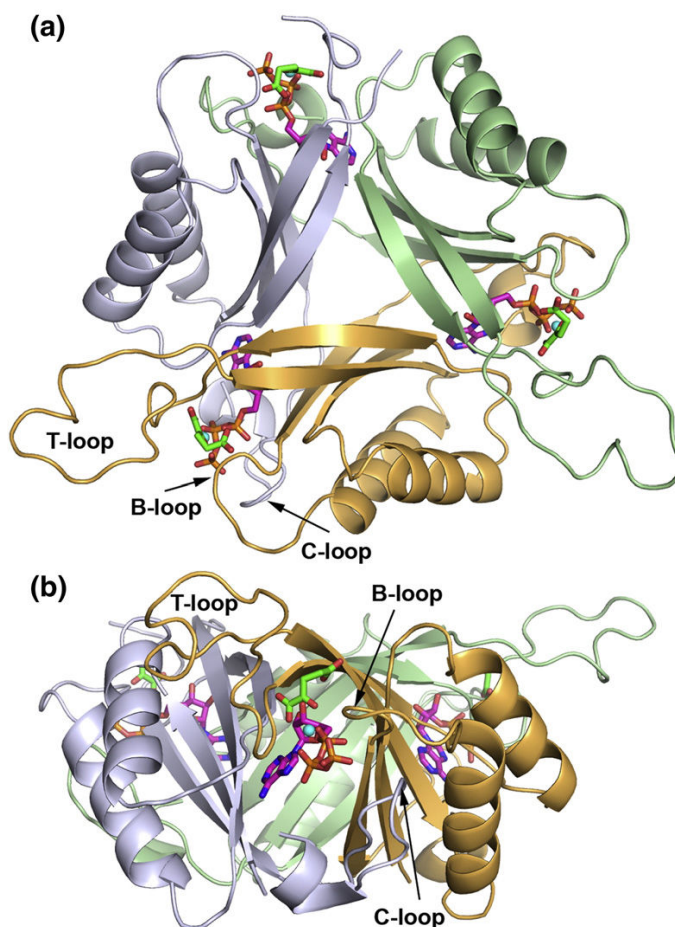


Figura 2 - Representação da estrutura do trímero de GlnZ. O trímero com ATP (rosa), 2-OG (verde) e Mg²⁺ (azul) é mostrado em vista superior (A) e lateral (B). Loop T (resíduos 37–55), loop B (resíduos 82–88), e loop C (resíduos 102–105) são indicados por setas. Fonte: Truan e colaboradores, 2010.

A proteína GlnB de *E. coli* sensoria o estado de nitrogênio da célula integrando o sinal de 2-OG e glutamina, o primeiro por ligação alostérica e o segundo pelo efeito que a glutamina tem sobre a enzima GlnD (LEIGH; DODSWORTH, 2007). A alta concentração de glutamina ativa a função UR de GlnD, que remove os grupamentos uridilil de PII. Em *E. coli* GlnB desuridililada interage com a enzima Adenilil transferase (ATase), sinalizando alta concentração de nitrogênio e promovendo a inativação da glutamina sintetase (GS) por adenilação progressiva de suas 12 subunidades. Quando a concentração de nitrogênio fixado é baixa, a GS é ativada por desadenilação também catalisada pela ATase complexada à proteína GlnB-UMP (NINFA e JIANG, 2005; LEIGH; DODSWORTH, 2007). GlnB não uridililada regula ainda a atividade da proteína NtrB que, por sua vez, regula o estado de fosforilação da proteína NtrC.

A proteína paróloga de GlnB, GlnK, em *E. coli* é co-expressa com o gene *amtB* que codifica para uma proteína transmembrana envolvida no transporte de

amônio (AmtB). As proteínas GlnK e GlnB de *E. coli* apresentam 67% de identidade (VAN HEESWIJK, 1996). Em *E. coli*, GlnB e GlnK apresentam funções sobrepostas, como o controle da atividade de NtrB e da adenililtransferase (ATase), embora GlnB seja mais efetiva nessas funções (ATKINSON e NINFA, 1999). GlnK também responde a sinais de estado de nitrogênio por uridililação no resíduo 51 (ATKINSON; NINFA, 1998). Uma das funções mais discutidas de GlnK é a sua interação com AmtB, bloqueando o canal transportador de amônia. Essa interação ocorre pela região do *loop* T, em função disto, ocorre apenas quando GlnK encontra-se livre (desuridililada) (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011).

O gene *glnB* de *A. brasilense* foi identificado por de Zamaroczy e colaboradores (1990) e codifica para a proteína GlnB. Esta proteína é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio (de ZAMAROCZY *et al.*, 1990; de ZAMAROCZY *et al.*, 1993; HUERGO *et al.*, 2003). Em 1996, de Zamaroczy e colaboradores identificaram um gene que codifica para outra proteína PII em *A. brasilense* e denominaram-na GlnZ. A expressão de *glnZ* é monocistrônica e controlada pela proteína NtrC, sendo aumentada em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998).

As proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB e GlnZ, apresentam 112 resíduos de aminoácidos e 81% de similaridade entre si (Figura 3) (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Apesar da alta similaridade entre essas proteínas, elas apresentam diferentes funções. Em *A. brasilense*, GlnB está envolvida com a ativação da proteína NifA e com a desfosforilação de NtrC sob condições de excesso de nitrogênio. GlnZ e GlnB estão relacionadas com o transporte de íons amônio (de ZAMAROCZY, 1998; HUERGO *et al.*, 2007) e regulação pós-traducional da nitrogenase em resposta à amônia (HUERGO *et al.*, 2005; 2007; KLASSEN *et al.*, 2005), sendo que GlnB sensoria o rápido aumento na concentração de amônio enquanto GlnZ é principalmente responsável por sinalizar o retorno a condições de depleção de amônio (KLASSEN *et al.*, 2005). Tanto a proteína GlnZ quanto GlnB de *A. brasilense* tem capacidade de ligar AmtB (HUERGO, *et al.*, 2007).

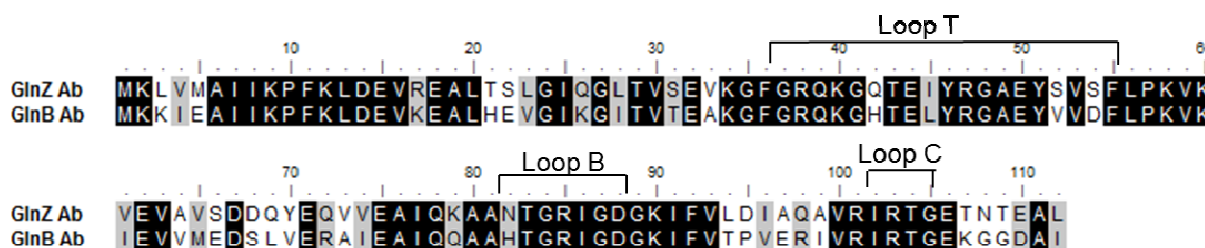


Figura 3 – Alinhamento (clustal W) das proteínas GlnZ e GlnB de *A. brasilense*. Resíduos conservados são mostrados em preto; resíduos similares são mostrados em cinza; resíduos diferentes são mostrados em branco. As regiões dos *loops* estão indicadas.

PII apresentam sítios de ligação a efetores (ATP, ADP e 2-OG) localizados nas três fendas laterais entre os monômeros. A ligação desses efetores pode promover alterações conformacionais no *loop* T, interferindo (positiva ou negativamente) na interação das proteínas PII com proteínas alvo (XU *et al.*, 1998; TRUAN *et al.*, 2010). A estrutura de GlnZ ligada a Mg-ATP e 2-OG é mostrada na figura 2.

Ensaio *in vitro* com as proteínas GlnB e GlnZ indicam que as proteínas PII de *A. brasilense* são uridililadas pela enzima GlnD na presença de ATP e 2-OG, sendo a uridililação inibida por glutamina (ARAÚJO *et al.*, 2004; 2008). As proteínas PII de proteobactérias em geral podem ser encontradas como trômeros livre, mono, di ou tri-uridililados e sua modificação covalente é importante para direcionar sua interação com suas proteínas alvo, como DraT, DraG e AmtB (VAN DOMMELLEN *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2006; HUERGO *et al.*, 2006a, 2007 e 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Proteínas PII são reconhecidas por sensoriar e regular o estado de nitrogênio celular, que é principalmente sinalizado por glutamina e 2-OG, em ligação a GlnD e PII, respectivamente (KAMBEROV *et al.*, 1995). 2-OG sinaliza o estado de nitrogênio da célula por participar da sua assimilação. Muitos procariotos possuem a via de assimilação GS/GOGAT (Glutamato sintase ou Glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase) na qual GS assimila amônia pela conversão de glutamato a glutamina e GOGAT então transfere o grupo amino da glutamina para 2-OG, gerando 2 glutamatos e, desta forma, reduzindo os níveis de 2-OG. Depois de sintetizados, glutamato e glutamina darão origem a outros compostos (LEIGH; DODSWORTH, 2007). Desse modo, 2-OG serve como esqueleto carbônico para a síntese de aminoácidos e sua concentração intracelular pode sinalizar deficiência (alto 2-OG) ou suficiência (baixo 2-OG) de nitrogênio. *A. brasilense* apresenta ainda

a enzima glutamato desidrogenase (GDH), mas esta apresenta um papel menor na síntese de glutamato, com afinidade menor que GS (WESTBY *et al.*, 1987).

Proteínas PII apresentam três sítios de ligação a efetores localizados nas fendas laterais entre as subunidades dos trímeros (figura 2). Esses sítios podem ser ocupados por ATP e 2-OG ou ADP, sendo que em *E. coli*, a ligação de ATP aos sítios apresenta cooperatividade negativa e ADP se liga de maneira competitiva com ATP (FORCHHAMMER, 2004; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). Um único trímero de PII pode apresentar seus três sítios ocupados por diferentes ligantes (exemplo: 2 ATPs e 1 ADP). Desse modo, surgiu a hipótese de que essas proteínas poderiam sensoriar o estado energético da célula refletido na relação ATP/ADP. Dados de dosagem *in vivo* desses metabólitos em *E. coli* revelaram que 2-OG varia bem mais que ADP ou ATP após choque de amônio em células crescidas em condição limitante de nitrogênio, diminuindo ~5 vezes sua concentração, enquanto ADP aumentou ~2 vezes e ATP diminuiu muito pouco (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). Apesar disto, a proporção ATP/ADP variou bastante, indo de 7 (limitação N) para 3 em 30 segundos após choque de amônio. Esse mesmo grupo detectou que a ligação de 2-OG a GlnK de *E.coli* está relacionado ao aumento da afinidade desta proteína por ATP e diminuição da afinidade por ADP, sendo que este efeito antagonista 2-OG-ADP parece ser crítico para a formação do complexo GlnK-AmtB (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010).

Os níveis de 2-OG têm potencial de sinalizar suficiência de carbono celular, além de sinalizar deficiência de nitrogênio. Assim, surgiu a hipótese de que proteínas PII podem sensoriar a relação C/N celular, integrando um sinal de nitrogênio (glutamina e 2-OG), com um sinal de carbono (2-OG) (NINFA *et al.*, 2000; NINFA; JIANG, 2005; COMMICHAU *et al.*, 2006). Recentemente, foi mostrado que proteínas PII são capazes de regular enzimas dedicadas ao metabolismo de carbono, suportando que estas proteínas podem sensoriar os níveis de carbono celular. A proteína PII de *A. thaliana* se localiza no cloroplasto e é capaz de inibir a enzima chave na biossíntese de lipídeos Acetil-CoA carboxilase e essa inibição é diminuída na presença de 2-OG, oxaloacetato (OAA) ou piruvato (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010). Estudos anteriores com GlnB de *E. coli* indicaram que ela pode ligar OAA ou piruvato, embora com menor efetividade que 2-OG

(KAMBEROV *et al.*, 1995). Estes dados suportam que proteínas PII têm potencial de sensoriar o estado de carbono na célula.

1.8. Proteína AmtB

A proteína AmtB pertence a família de transportadores de amônio Amt/Mep/Rh. Dentre os organismos que têm seu genoma completamente sequenciado, os genes codificadores para proteínas da família Amt não foram encontrados apenas em algumas bactérias patogênicas (THOMAS *et al.*, 2000). Em Bacteria, Archaea, fungos e plantas as proteínas Amt facilitam a entrada de amônia quando os níveis extracelulares de amônia estão baixos (WINKLER, 2006).

Em *E. coli* e muitos outros procariotos, o gene que codifica AmtB (*amtB*) está em um *operon* junto com o gene que codifica para a proteína PII GlnK (*glnK*) (THOMAS *et al.*, 2000). Em *A. brasilense*, o gene *amtB* é expresso de forma monocistrônica, e tem sua expressão aumentada em condições de limitação de nitrogênio, de forma dependente do fator σ^{54} da RNA polimerase e da proteína NtrC (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). A estrutura 3D da proteína AmtB de *E. coli* revelou ser um homotrímero no qual cada subunidade passa a membrana 11 vezes, formando um estreito canal dentro de cada monômero, o qual, se acredita, conduz a amônia desprotonada (NH₃) (KHADEMI *et al.*, 2004).

As proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, GlnK de *Azotobacter vinelandii* e GlnB e GlnZ de *A. brasilense* associam-se à membrana interna de forma dependente de amônio e da proteína AmtB (COUTTS *et al.*, 2002; HUERGO *et al.*, 2006) assim como GlnK de *Corynebacterium glutamicum*, *R. rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Bacillus subtilis*, *Methanococcus jannaschii* e *Herbaspirillum seropedice* (WOLFE *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008; STROSSER *et al.*, 2004; DETSCH; STULKE, 2003; YILDIZ *et al.*, 2007; HUERGO *et al.*, 2010). A formação do complexo foi ainda postulada em *Archaeoglobus fulgidus* (ANDRADE *et al.*, 2005). A interação de proteínas da família P_{II} com a membrana de forma dependente da proteína AmtB foi relatada em Firmibactérias, Actinomicetos e γ -proteobactéria (DETSCH; STULKE, 2003; STROSSER, *et al.*, 2004; COUTTS *et al.*, 2002), sugerindo que a interação entre proteínas P_{II} e AmtB seja um processo universal em procariotos.

Dados cristalográficos do complexo AmtB e GlnK de *E. coli* confirmam que esta interação depende exclusivamente do *loop* T de GlnK (Figura 4). A interação bloqueia o canal de amônia de AmtB através do resíduo R47 de GlnK (CONROY, *et al.*, 2007; GRUSWITZ *et al.*, 2007). Esta interação também promove o sequestro de proteínas PII na membrana (HUERGO *et al.*, 2006; HEINRICH *et al.*, 2006) podendo levar ao sequestro de outras proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio por intermédio da formação de complexos ternário com PII. Devido a interação AmtB-PII ser altamente conservada, pode-se deduzir que a interação PII-AmtB em outros organismos também ocorra de forma semelhante a observada na estrutura do complexo AmtB-GlnK de *E. coli*.

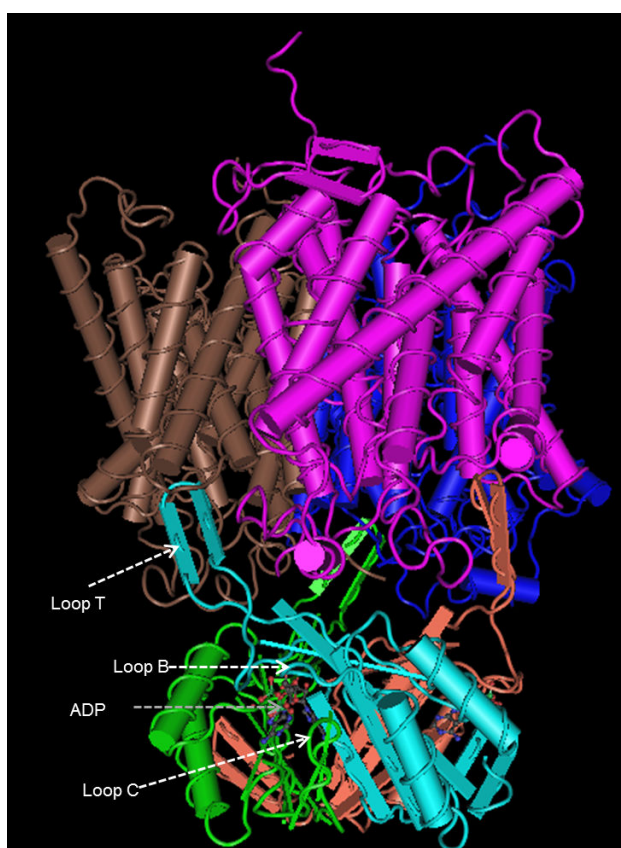


Figura 4 – Representação do complexo AmtB-GlnK de *E. coli*. Vista lateral do complexo AmtB-GlnK (PDB 2NUU) (CONROY *et al.*, 2007). As cadeias em marrom, rosa e azul correspondem a monômeros de AmtB (trímero). As cadeias verde, laranja e ciano correspondem a monômeros de GlnK (trímero). As setas brancas indicam os *loops* de GlnK e a seta cinza indica o ADP ligado na fenda lateral do trímero.

1.9. Papel das proteínas GlnB, GlnZ e AmtB na regulação de DraT e DraG

A regulação do processo de fixação de nitrogênio mediada pelas proteínas PII é caracterizada por interações proteína-proteína. As proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB e GlnZ, interagem diretamente com as proteínas reguladoras da NifH, DraT e DraG, respectivamente. Quando em condição de fixação de nitrogênio (O_2 e baixo NH_4), GlnB e GlnZ encontram-se uridililadas no citoplasma (HUERGO, 2006).

A interação GlnB-DraT é dependente do estado de uridililação de GlnB, sendo que a formação do complexo é favorecida quando GlnB está desuridililada e em alta concentração de ADP, mas pode também ocorrer quando GlnB está uridililada (HUERGO *et al.*, 2006b; HUERGO *et al.*, 2009). A interação DraT-GlnB é favorecida em condições de alta concentração de amônia, tendo como consequência a ativação de DraT e inativação da NifH, uma vez que as condições são desfavoráveis à fixação (Figura 5).

DraG por sua vez, interage com GlnZ tanto na forma uridililada quanto desuridililada, mas a interação é mais forte quando GlnZ encontra-se desuridililada, sendo que essa interação ocorre na presença de ADP mas não de ATP ou AMP (HUERGO *et al.*, 2009). O modelo proposto com base em evidências experimentais obtidas até agora indicam que em condições de fixação, DraG se encontra no citoplasma desligada de GlnZ uridililada (HUERGO *et al.*, 2012), e assim, NifH está ativa. Após um choque de amônio, GlnZ é desuridililada e se liga a DraG. Essa ligação GlnZ-DraG não altera a estrutura de DraG (Figura 6), indicando que uma alteração estrutural devido a interação com GlnZ não seria a causa de sua inativação. Quando desuridililada e na presença de ADP, GlnZ interage simultaneamente com AmtB e DraG, formando um complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG que é necessário para inativação de DraG *in vivo* (HUERGO, 2006; HUERGO *et al.*, 2007, 2009) (figura 5).

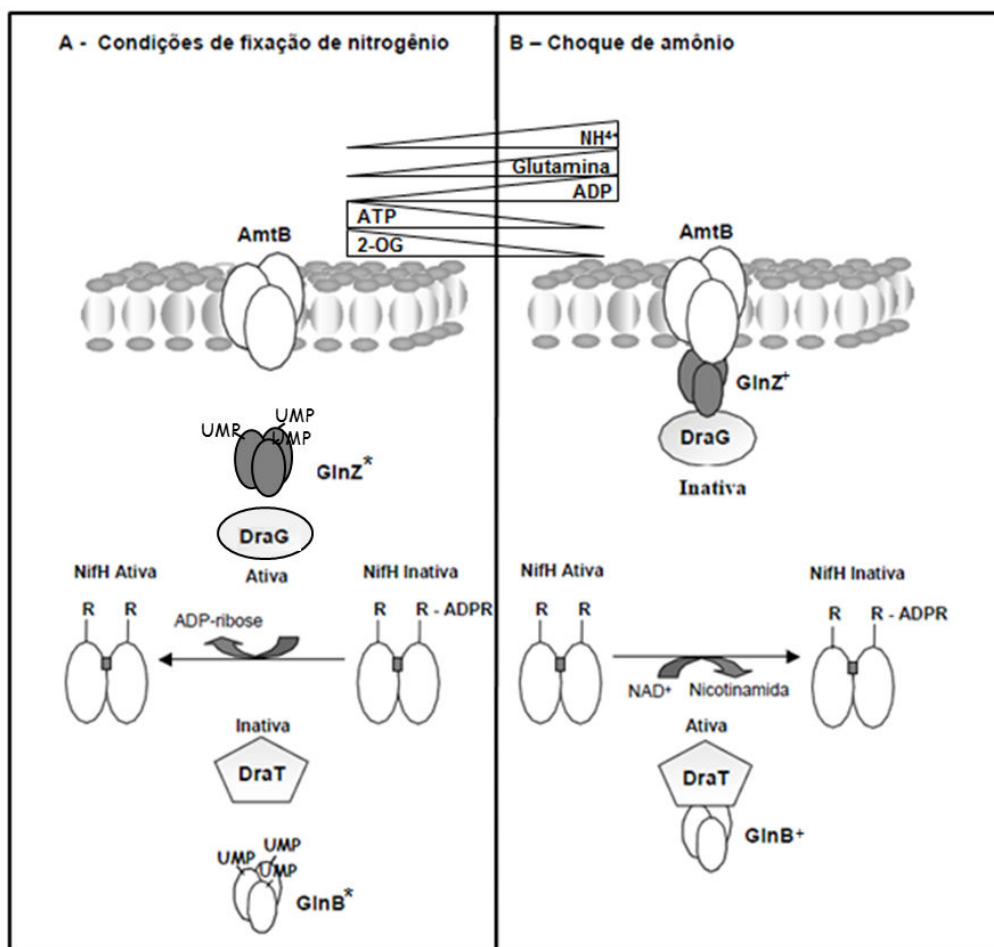


Figura 5 – Modelo para regulação das atividades das enzimas DraT e DraG em resposta a adição de amônio em *A. brasilense*. Fonte: HUERGO, 2006, com modificações. *GlnB** and *GlnZ** indicam proteínas completamente uridililadas. *GlnB+* and *GlnZ+* indicam proteínas desuridililadas e ligadas a ADP.

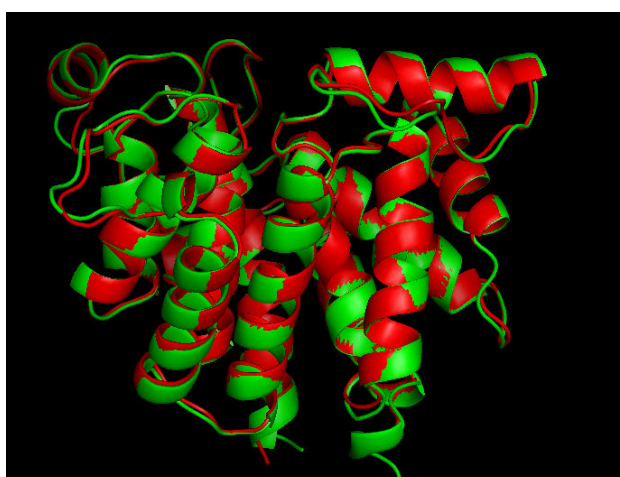


Figura 6 – Estrutura da proteína DraG quando ligada ou não ligada a GlnZ. Sobreposição da estrutura da DraG (PDB 3G9D – LI *et al.*, 2009) e DraG-GlnZ (PDB 3O5T – RAJANDRAN *et al.*, 2011). As cadeias em vermelho correspondem a proteína DraG sem interação enquanto as cadeias em verde correspondem a estrutura da DraG quando ligada a GlnZ. Fonte da figura: L.F. Huergo.

Huergo (2006) verificou que após o choque de amônio, o mutante *amtB* apresentava baixa quantidade de NifH ADP-ribosilada, indicando que nessa condição (ausência de AmtB) a proteína DraG encontrava-se ativa, removendo grupos ADP-ribose e ativando NifH mesmo em condições contrárias à fixação (choque de amônio). Este dado reforça a hipótese de que a formação do complexo ternário DraG-GlnZ-AmtB necessária para inativação de DraG.

Após o choque de amônio, a proteína GlnB encontra-se desuridilada, provavelmente ligada a ADP, podendo interagir fisicamente com AmtB e DraT. Porém, dados experimentais sugerem que um complexo ternário entre as três proteínas não é formado *in vivo*, indicando que, provavelmente, DraT e AmtB ligam-se a GlnB de forma competitiva, provavelmente através do *loop* T da proteína GlnB. De fato, a construção de mutantes GlnB de *R. rubrum* e análise por sistema duplo-híbrido revelou que a interação DraT-GlnB requer a região do *loop* T pois mutantes nos aminoácidos H42, V52 e F55 perderam a capacidade de interagir com DraT (ZHU *et al.*, 2006). Além disso, o estado de uridilação do *loop* T interfere na formação do complexo DraT-GlnB em *A. brasilense*, sendo favorecido quando GlnB encontra-se desuridilada (HUERGO *et al.*, 2009).

As proteínas DraT e DraG não apresentam similaridade entre si, porém seus ligantes GlnB e GlnZ apresentam 81% de similaridade (Figura 6). Embora essa similaridade seja alta, GlnB e GlnZ são altamente específicas para interação com DraT e DraG, sendo que as bases estruturais para esta especificidade ainda não são compreendidas.

2. JUSTIFICATIVA

O processo de fixação biológica de nitrogênio é amplamente estudado devido à possibilidade de ser empregado para a otimização da produtividade de plantas. O uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio pode acarretar em uma economia de bilhões de dólares/ano (HUNGRIA *et al.*, 2010) com a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados. Além disso, a redução desses fertilizantes é hoje uma preocupação mundial devido aos impactos ambientais causados pelo uso dos mesmos.

Devido à grande capacidade que *A. brasilense* tem de colonizar raízes de gramíneas de interesse agrícola, sua ampla distribuição geográfica e sua eficiência em fixar nitrogênio, este organismo é uma alternativa promissora para suprir as gramíneas com nitrogênio fixado (PEDROSA, 1987).

Visando aprimorar cada vez mais a utilização desses organismos em associação com plantas, é de suma importância que seu metabolismo seja bem conhecido. Considerando-se o fato das proteínas DraG, DraT e PII exercerem um papel fundamental no processo de fixação biológica do nitrogênio, estando relacionadas com processos regulatórios desta via, faz-se necessário um melhor entendimento de como elas atuam e como se comportam diante de alterações fisiológicas (presença/ausência de N, estado energético da célula).

Com essa finalidade, o presente trabalho tem como objetivos determinar motivos estruturais nas proteínas PII responsáveis pela especificidade na interação com as enzimas DraT e DraG em *Azospirillum brasilense* e investigar como alterações nos níveis celulares de 2-oxoglutarato e energia influenciam a atividade das proteínas PII.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar motivos estruturais nas proteínas PII responsáveis pela especificidade na interação com as enzimas DraT e DraG em *Azospirillum brasilense* e investigar como alterações nos níveis celulares de 2-oxoglutarato e energia influenciam a atividade das proteínas PII neste organismo.

.

3.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar as proteínas His-DraT, DraG, His-DraG, GlnB, GlnZ, His-GlnD e His-AmtB de *A. brasilense*
- Expressar e purificar formas mutantes das proteínas GlnZ e GlnB [GlnZ (D68S; Q69L; D68S-Q69L; Q39K; S52V-S54D; Q42H-S52V-S54D; D95P; D68S-D95P, Δ 42-54), GlnB (H42Q; Δ 42-54) e quimeras BZ e ZB de *A. brasilense*
- Analisar a estrutura quaternária das proteínas mutantes PII através de eletroforese nativa
- Avaliar as proteínas mutantes quanto a capacidade de interação com as proteínas DraT, DraG e AmtB *in vitro*
- Determinar a capacidade de uridililação das proteínas PII mutantes pela enzima GlnD de *A. brasilense*
- Determinar o papel da relação ATP/ADP, diferentes concentrações de 2-oxoglutarato e dos metais Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} nas interações *in vitro* entre as proteínas AmtB- PII e DraG-GlnZ
- Determinar as flutuações nos níveis celulares de ATP, ADP e 2-oxoglutarato em resposta a um choque de amônio em *A. brasilense*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Bactérias e Plasmídeos

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS

<i>Escherichia coli</i>	Característica	Referência
BL21 (λDE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (<i>λclts</i> 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
DH10B	Sm ^r , F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
<i>A. brasilense</i>		
FP2	Nal ^r Sm ^r Estirpe selvagem, SP7 Nif ⁺	Pedrosa e Yates, 1984
UB4	Nal ^r Km ^r Nif ⁺ <i>draG::km</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1992

TABELA 2 – PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Característica	Referência
pMSA4	Km ^r . Expressa a proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> promotor T7	MOURE <i>et al.</i> , 2012
pET28a	Vetor de expressão/ promotor T7	Novagen
pLH25PET	Km ^r . Expressa a proteína GlnB de <i>A. brasilense</i> promotor T7	HUERGO <i>et al.</i> , 2006a
pLH25PET del <i>loop</i> T	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnB del <i>loop</i> T (Δ42-54) de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pLH25PETGlnB H42Q	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnB H42Q de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pLHDK7PZHis	Cm ^r . Expressa a proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> promotor T7	HUERGO <i>et al.</i> , 2006a
pLHPETDRAGwt	Km ^r (pET28a) Expressa a proteína DraG de <i>A. brasilense</i> promotor T7	HUERGO <i>et al.</i> , 2006b
pLHPETDRAT	Km ^r (pET28a) Expressa a proteína His-DraT de <i>A. brasilense</i> promotor T7	HUERGO, 2006

pMSA4 D68SD95P	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ D68S D95P de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4 delllopT	Km ^r . Expressa a proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> com deleção do loop T ($\Delta 42-54$). Promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4 Q22HS52VS54D	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ Q22HS52VS54D de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010.
pMSA4 S52VS54D	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ S52VS54D de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4 D68S	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ D68S de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4 D95P	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ D95P de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4 Q69L	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ Q69L de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Este trabalho
pMSA4 D68SQ69L	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ D68SQ69L de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4Q39E	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ Q39E de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSA4Q39K	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ Q39K de <i>A. brasilense</i> promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSGlnBZ	Km ^r Quimera N-terminal de GlnB e C-terminal de GlnZ. <i>Bgl II</i> . promotor T7	SCARDUELLI, 2010
pMSGlnZB1	Km ^r Quimera N-terminal de GlnZ e C-terminal de GlnB. Promotor T7. <i>SacII/Bam HI</i>	SCARDUELLI, 2010
pLHPEThisDRAG	Km ^r . Expressa His-DraG de <i>A. brasilense</i> (Km ^r)	HUERGO <i>et al.</i> , 2006b

4.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E.coli* foram: Luria-Broth (LB) e LA com as seguintes composições:

Luria-Broth ou LB (SAMBROOK *et al.*, 1989):

extrato de levedura 5 g/L

NaCl 10 g/L

Tryptona 10 g/L

LA (SAMBROOK *et al.*, 1989): meio LB + 15 g/L de ágar.

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato. A composição e o preparo do meio NFb estão descritos abaixo.

O meio NFB lactato possui a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻² g/L
Lactato de sódio	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴ g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L
pH	6,5

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl 20 mM ou glutamato 5 mM. As soluções de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L e KH₂PO₄ 159,5 g/L) e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. O meio NFb lactato sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido.

4.3. Antibióticos

Os antibióticos empregados e suas respectivas concentrações finais foram: canamicina (Km) 100 µg/mL, ácido nalidíxico (Nal) 20 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL e estreptomicina (Sm) 20 µg/mL para *E. coli* ou 80 µg/mL para *A. brasilense*. As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989 e mantidas a 4°C.

4.4. Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967). Células de *A. brasilense* foram ensaiadas para atividade de nitrogenase em meio NFb lactato líquido.

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato contendo antibióticos adequados e NH₄Cl 20 mM ou glutamato 0,5 mM como fonte de nitrogênio. A atividade de nitrogenase em meio líquido foi realizada em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio NFb lactato, adicionado de fosfato (50 mL/L), Glutamato 5 mM e 1% de LB. Como inóculo foi utilizado 2 ou 4 mL de uma cultura saturada previamente cultivada em meio NFb lactato contendo 20 mM de NH₄Cl como fonte de nitrogênio. Após 18 – 24 horas de crescimento a 30°C, os frascos foram vedados com fita crepe e então injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco). A cultura foi incubada nas mesmas condições por 40 minutos, foi coletada uma amostra de 500 µL da fase gasosa para análise do etileno formado em cromatógrafo gasoso. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio. Para o cálculo do etileno formado foi utilizado um padrão de etileno fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno total formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

4.5. Amplificação de DNA através de PCR

Para amplificar DNA, foi utilizado o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER e WILSON, 1991). Os "primers" utilizados foram sintetizados pela Invitrogen. A maioria das reações foi composta por: tampão de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, aproximadamente 20ng de DNA molde e 1U de Taq DNA polimerase em 25 µL de volume final de reação. Algumas reações de PCR foram realizadas usando-se a enzima *PfuTurbo* da Stratagene, seguindo especificações do fabricante. Vários parâmetros de ciclos de amplificação foram testados.

4.6. Purificação de DNA plasmideal

A purificação do DNA plasmideal nas bactérias *E. coli* foi realizado segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um e meio mililitros de uma cultura de células, incubada durante a noite em meio LB a 37°C, foi centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos. O sedimento foi suspenso em tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e a lise celular efetuada com a adição de 1% SDS e 0,2 M NaOH. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com Kcaf (acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L). Após incubação por 10 minutos em banho de gelo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a amostra foi agitada em agitador de tubos sendo então centrifugada. A fase aquosa foi coletada e adicionada de 2 volumes de etanol 96% com a finalidade de precipitar o DNA plasmideal. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80%, centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos e seco a vácuo ou em bancada e depois ressuspenso em água. Alternativamente, DNA plasmideal foi purificado usando-se o kit de purificação de plasmídeos da Novagen, segundo recomendação dos fabricantes.

4.7. Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al* (1989). O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 mg/ml) em transiluminador de luz ultravioleta e o perfil eletroforético foi registrado fotograficamente utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.8. Reação de Mutagênese

As modificações pontuais dos nucleotídeos dos genes *glnB* e *glnZ* foram realizadas a partir de kit de mutagênese sítio dirigida (Agilent) com a enzima *pfu* Turbo seguindo recomendações do fabricante e plasmídeos sem a mutação como molde. A reação foi preparada num volume final de 50 µL, sendo composta por tampão 1X, 10 pmol de cada *primer* (3' e 5'), 100 ng de DNA molde, 0,2 µM dNTP mix e 2,5 U da enzima *pfu* Turbo (Stratagene). Nessa reação são utilizados dois plasmídeos (*forward* e *reverse*) contendo a mutação de interesse que apresentam uma região sobreponível. Após os ciclos de PCR, os plasmídeos replicados apresentam-se sobrepostos, mas não fechados (cíclicos). A ciclização dos plasmídeos ocorre depois que estes são transformados em bactérias competentes. As condições utilizadas para PCR foram 1 ciclo de 95°C por 1 minuto e 30 ciclos - 95°C 50 segundos, 55°C 50 segundos, 68°C por 12 minutos. Após o PCR, as amostras foram tratadas com a enzima de restrição *DpnI* para que o DNA molde (metilado) fosse fragmentado, restando assim apenas o DNA sintetizado durante a PCR, contendo a mutação.

O primer mutagênico e os plasmídeos molde utilizados são mostrados na tabela 3.

TABELA 3 - PLASMÍDEO UTILIZADO COMO MOLDE E PRIMERS MUTAGÊNICOS USADOS

PLASMÍDEO- MOLDE	MODIFICAÇÃO ESPERADA COM O USO DOS PRIMERS MUTAGÊNICOS
pMSA4 (<i>glnZ</i>)	Q69L (5'-gtgtccgacgacctgtacgagcaggtg-3') Q69L antisense 5'-cacctgctcgtacaggctcgtcggacac-3'

4.9. Transformação bacteriana por choque térmico

4.9.1. Preparo de células

A preparação de células termocompetentes foi realizada segundo Chung *et al.* (1989). Cinco mililitros de células (BL21 ou DH10B) foram crescidos durante a noite em meio LB. Na manhã seguinte as culturas foram diluídas em meio LB (1:100 v/v) de acordo com a quantidade de células a serem transformadas (1 mL por transformação). A cultura foi então crescida até densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,2 e 0,5. Alíquotas de 1mL de cultura foram transferidas para tubos de 1,5 mL pré-resfriados em gelo e incubadas por 10 minutos, sendo em seguida centrifugadas por 1 minuto a 13400 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspenso em 100 μ L de TSS (LB com PEG 10% (m/v), DMSO 5% (v/v) e 30 mM Mg^{2+} ($MgSO_4$ ou $MgCl_2$; pH 6,5; filtrada em filtro de 0,22 μ m). As alíquotas foram submetidas a choque térmico ou congeladas a -80°C.

4.9.2. Choque térmico

As alíquotas de células foram mantidas no gelo por 30 minutos. O DNA plasmideal de interesse foi adicionado à mistura de células, mantendo-se no gelo por 30 minutos, seguido de banho a 42°C por 2 minutos e novamente banho de gelo por 2 minutos. As células suspensas em 1 mL de LB, e recuperadas a 37°C por 40

minutos. Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

4.10. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes

Eletroforese de proteínas, sob condições desnaturantes (contendo SDS), foram realizadas em gel de poliacrilamida de 7,5% a 12,5%, dependendo o tamanho da proteína a ser analisada, como descrito por LAEMMLI (1970). As soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito por Huergo (2006).

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a 100-200 V em tampão de corrida 1X por 1 a 2 horas. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue ou com prata, ou transferido para membranas (western blot) dependendo do ensaio.

4.11. Expressão das proteínas de interesse

A expressão das proteínas DraG, His-DraG, His-DraT e PII (nativas e mutantes) de *A. brasilense* foi realizada em *E. coli* BL21 (λDE3), contendo o plasmídeo que expressa a proteína de interesse. Células de *E. coli* BL21 foram cultivadas durante a noite em 20 ml de meio LB contendo o antibiótico adequado, a 37°C. Esse pré-inóculo foi então vertido em 400 ml de LB, contendo 40 mM de NH₄Cl e antibiótico adequado, sendo cultivado a 37°C até densidade óptica a 600 nm de 0,5 (DraG ou DraT) ou 0,7 (PII). À cultura, adicionou-se então 0,3 mM de IPTG, sendo incubada a 37°C por 3 horas ou durante a noite a 20°C (16°C para DraT) sob agitação.

As culturas foram mantidas por 30 minutos em gelo e depois coletadas por centrifugação (5 minutos, 5000 rpm 4°C) e ressuspensas em 20 mL de tampão de sonicação: para DraT (50 mM Tris-HCl pH8; NaCl 300 mM; Glicerol 10%), para DraG (50 mM Tris-HCl pH8; NaCl 100 mM; Glicerol 10%), para PII (50 mM Tris-HCl pH7,5;

KCl 100 mM; Glicerol 20%). As células foram lisadas por sonicação em banho de gelo (15 ciclos de 15 segundos com 15 segundos de intervalo) e novamente centrifugadas (30 minutos, 30.000 x g a 4°C). As frações solúvel e insolúvel foram separadas, as proteínas solúveis foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue.

Para as proteínas PII, após a sonicação, o extrato celular foi aquecido por 15 minutos a 70°C e depois mantido em gelo por 10 minutos, antes da centrifugação por 30 minutos a 30.000 x g e 4°C. Essa etapa de aquecimento elimina grande parte dos contaminantes, resultando em uma purificação mais eficiente (MOURE *et al.*, 2012). Os sobrenadantes foram aplicados a colunas cromatográficas.

4.12. Purificação da proteína His-DraG de *A. brasilense*

A proteína DraG fusionada com uma seqüência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-DraG) foi purificada conforme Huergo *et al.*, 2005. A coluna HiTrap Chelating-Ni⁺² (GE Healthcare) de 1 ml acoplada a uma bomba peristáltica foi carregada com NiCl₂ como descrito pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5 mL do tampão 1 (TP1 50 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 M NaCl; Glicerol 10%) e em seguida, 20 mL do extrato livre de células, preparado como descrito no item 4.11, foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 2 mL de TP1 e 10 mL de TP2 (TP1 contendo 10 mM de imidazol). A eluição da proteína His-DraG foi realizada em gradiente crescente de imidazol. Foram adicionados 5 mL de TP3 (50 mM Tris-HCl pH8; 0,1 M NaCl; 50 mM imidazol; glicerol 10%), 5 mL de TP4 (TP3 contendo 100 mM de imidazol), 5 mL de TP5 (TP3 contendo imidazol 300 mM), 5 mL de TP6 (TP3 contendo 500 mM de imidazol). Foram coletadas frações de 1 mL, as frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE. Após a purificação uma pequena parte da proteína purificada precipitou. Em função disso, as frações foram centrifugadas (20.000 x g, 20 minutos, 4°C) e as frações solúveis com maior grau de pureza foram agrupadas, dialisadas, aliquotadas e armazenadas a -70°C.

4.13. Purificação da proteína His-DraT de *A. brasilense*

A proteína DraT fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-DraT) foi purificada de maneira semelhante à proteína His-DraG. A coluna Hi-Trap foi carregada com NiCl_2 como descrito pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5 mL do tampão de sonicação para DraT (TP1: 50 mM Tris-HCl pH8; NaCl 0,3 M; Glicerol 10%) em seguida, 20 mL do extrato livre de células, preparado como descrito no item 4.11, foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 10 mL de TP1 e 5 mL de TP2 (TP1 contendo 10 mM de imidazol). Foram adicionados 5 mL de TP3 (50 mM Tris-HCl pH8; 0,3 M NaCl; 50 mM de imidazol; glicerol 10%), 5 mL de TP4 (TP3 contendo 100 mM de imidazol), 5 mL de TP5 (TP3 contendo 300 mM de imidazol), 5 mL de TP6 (TP3 contendo 500 mM de imidazol). Foram coletadas frações de 1 mL, diluídas em 9mL de tampão de sonicação. Essa diluição foi utilizada devido a proteína His-DraT apresentar um limite solubilidade relacionado à concentração, precipitando quando em altas concentrações. Devido a essa precipitação, muita proteína era perdida nos protocolos utilizados. Com a etapa de diluição, a concentração obtida é menor, porém em volume maior, resultando em maior quantidade de proteína purificada (mg), sendo obtida em quantidades suficientes para os ensaios realizados.

As frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE, as frações com maior grau de pureza foram agrupadas e estocadas em alíquotas a -20°C , sem a etapa de diálise.

4.14. Purificação da proteína His-AmtB de *A. brasilense*

A proteína His-AmtB foi purificada de acordo com Rodrigues e colaboradores (2011) e gentilmente cedida por Thiago Estefano Rodrigues.

4.15. Purificação da proteína DraG de *A. brasilense*

A proteína DraG foi purificada de acordo com Huergo e colaboradores, 2007. A purificação foi realizada em coluna de Heparina de 5 mL (HiTrap Heparina GE Healthcare) acoplada ao sistema ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão A (Tris-HCl pH8; NaCl 0,1M) em seguida, 20 mL do extrato livre de células, preparado como descrito no item 4.11, foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A e a eluição foi realizada com gradiente linear crescente de tampão B (TrisHCl pH8; NaCl 1,0 M) num fluxo de 1 mL/min, com volume total de eluição de 10 volumes de coluna e frações coletadas de 1 mL.

As frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE. Após a purificação, as frações com maior grau de pureza foram agrupadas, dialisadas, aliquotadas e armazenadas a -70°C.

4.16. Purificação das proteínas GlnZ, GlnB e mutantes PII de *A. brasilense*

As proteínas PII GlnB e GlnZ nativas e mutantes foram purificadas em coluna de heparina (HiTrap Heparina) de 1 mL, acoplada a bomba peristáltica. A coluna foi pré-equilibrada com 10 mL de tampão 1 (TP1: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; KCl 0,1 M; Glicerol 20%) e em seguida, 20 mL do extrato livre de células, preparado como descrito no item 4.11, foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 10 mL de TPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5; KCl 0,1 M). A eluição da proteína foi realizada em gradiente crescente de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 7,5; KCl 1 M). Foram adicionados 5 mL de TP2 (10% TPB; 90% TPA), 2 mL de TP3 (15% TPB; 85% TPA), 2 mL de TP4 (20% TPB; 80% TPA), 2 mL de TP5 (25% TPB; 75% TPA), 2 mL de TP6 (30% TPB; 70% TPA), 2 mL de TP7 (35% TPB; 65% TPA), 2 mL de TP8 (40% TPB; 60% TPA) e 2 mL de TP9 (60% TPB; 40% TPA). Foram coletadas frações de 1 mL, e as frações obtidas foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE. As frações mais puras foram agrupadas, dialisadas, aliquotadas e armazenadas a -20°C.

Todas as proteínas mutantes se mostraram solúveis, apresentando comportamento semelhante às proteínas nativas durante a purificação e sendo eluídos entre 20 e 30% de TPB.

4.17. Purificação parcial da proteína NifH de *A. brasilense*

Para purificação da proteína NifH, células de *A. brasilense* UB4 foram crescidas conforme descrito no item 4.4. Esta estirpe foi escolhida por apresentar mutação no gene que codifica a enzima DraG, com isso, os grupos ADP-ribose não são removidos da proteína NifH. Isso é necessário para a realização de ensaios de atividade da proteína DraG *in vitro*, pois assim pode se monitorar o desaparecimento da banda correspondente a NifH-ADPR através de western blot.

Oitocentos mililitros de cultura celular foram crescidos em meio NFb lactato, em condições de fixação de nitrogênio, com glutamato 5 mM como fonte de nitrogênio, por aproximadamente 18 horas. A atividade da nitrogenase foi verificada conforme descrito no item 4.4 para se certificar que a nitrogenase estava sendo expressa. Foi adicionado 10 mM de NH_4Cl à cultura e a cultura foi mantida por 5 minutos a 120 rpm a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 10 minutos 4°C). O pellet foi ressuspenso em 30 mL de tampão de sonicação (Tris HCl pH 8 100 mM; 2 mM MgCl_2 , 0,5 mM MnCl_2 , DTT 0,1 mg/mL) sonicado em banho de gelo (15 ciclos de 15 segundos com 15 segundos de intervalo) e centrifugado (30.000 x g, 30 minutos a 4°C). O sobrenadante foi aplicado a coluna Q sepharose FF (Amersham Bioscience) de 20 mL acoplada ao sistema ÄKTA (GE Healthcare), pré equilibrada com TPA (Tris-HCL pH 8 50 mM; NaCl 0,1 M). A coluna foi lavada com 2 volumes de tampão A e a eluição foi realizada com gradiente linear crescente de TPB (Tris-HCL pH 8 50 mM; NaCl 1 M) de 0 a 70%, em 3 volumes de coluna. A lavagem da coluna foi feita com 70% de B (um volume de coluna). O fluxo utilizado foi de 5 mL/min e as frações coletadas foram de 1 mL, com detecção UV a 280 nm.

As frações que apresentaram maior quantidade de proteína foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com Comassie Blue. Algumas bandas foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF) para identificar quais correspondiam a proteína NifH. As frações contendo mais NifH foram agrupadas e

concentradas em filtro Amicom (Millipore) de 10000 MW em ciclos de 20 minutos, 5000 rpm a 4°C até a obtenção do volume de 1 mL. A fração obtida foi submetida a gel filtração em coluna Superose 12 10/300 de 24 mL, acoplada ao sistema ÄKTA. A eluição foi realizada com tampão deaerado (Tris-HCl pH 8 50 mM e NaCl 100 mM), com corrida isocrática e volume final de eluição igual a 1,5 volumes de coluna (~36mL). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min e as frações coletadas, 1 mL. As frações equivalentes aos picos obtidos foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% e analisadas por western blot e coloração com Comassie Blue.

4.18. Dosagem de proteína

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o Reagente de Bradford (Sigma). As reações foram preparadas em microplacas de 96 poços, sendo utilizados 20 µL de amostra e 180 µL de reagente. Para curva padrão, foi utilizado albumina bovina (BSA) em concentrações de 20 a 100 µg/mL. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, em 595 nm.

4.19. Identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS

A identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS foi realizada de acordo com Shevchenko e colaboradores (1996) com modificações. As bandas de interesse foram extraídas do gel SDS-PAGE e descoradas em tubos de plástico por sucessivas lavagens com uma solução de bicarbonato de amônio a 25 mM pH 8,0 e 50% de acetonitrila. Os fragmentos foram então desidratados com acetonitrila 100%. A digestão foi realizada com tripsina através de reidratação do gel com uma solução contendo tripsina 15 ng/µL em tampão bicarbonato de amônio 40 mM pH 8 e acetonitrila 10% durante 30 minutos a 4°C e, em seguida, este sistema foi incubado durante 16 horas a 37 °C. Um microlitro do sistema de digestão foi misturado com 1 µL de uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 0,1% saturada com a

matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). As amostras foram aplicadas em uma placa de MALDI até cristalizarem. Os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A aquisição das massas foi realizada no modo positivo utilizando voltagem de 20 kV. A lista de picos foi criada usando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). A identificação das proteínas foi realizada usando o software Mascot 2.2 e o banco de dados de proteínas de *A. brasilense* sp245 (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011).

4.20. Interação das proteínas DraG, DraT e AmtB com PII (nativas e mutantes) por ensaio de co-precipitação (*pull-down*) *in vitro*

Para os ensaios de interação as proteínas DraG-His, DraT-His e AmtB-His foram imobilizadas em resina de Ni^{2+} . Para cada uma destas proteínas, foram realizados ensaios de interação com as proteínas GlnZ e GlnB nativas e as diferentes proteínas mutantes.

Os ensaios de interação *in vitro* foram realizados utilizando a técnica de co-precipitação dos possíveis complexos formados na resina MagneHis- Ni^{2+} (Promega), segundo Huergo e colaboradores (2007), com adaptações. O tampão utilizado foi 50mM Tris-HCl pH 8, 10% glicerol (v/v), 100mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgCl_2 e 0,05% (p/v) LDAO (His-DraG e His-AmtB) ou 0,05% de Tween 20 para os ensaios utilizando a enzima His-DraT. Além de concentrações variadas dos efetores ADP, ATP e 2-OG, dependendo do ensaio realizado. Para cada reação, foram utilizados 12,5 μL de *beads* magnéticos. Os *beads* foram lavados com 200 μL de tampão, e então, foi adicionado 500 μL de tampão, 10 μg da proteína His-DraG ou 5 μg da proteína His-AmtB ou His-DraT, e 10 μg de proteína PII nativa ou mutante. A reação ocorreu por 5 minutos à temperatura ambiente, e então foram realizadas três lavagens com 300 μL de tampão. Após as etapas de lavagem, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 1M de imidazol (AmtB-His) ou 15 μL tampão de amostra, aplicadas e separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% e coradas com Coomassie Blue, permitindo assim posterior análise dos resultados.

4.21. Eletroforese de proteínas sob condições não – desnaturantes

As condições de eletroforese não-desnaturantes foram realizadas conforme descrito por ARAÚJO (2003). Os géis de poliacrilamida não-desnaturantes foram utilizados para analisar a conformação das proteínas, uma vez que esta técnica mantém a conformação nativa das proteínas, permitindo que pequenas alterações (mutações) sejam percebidas.

As amostras utilizadas nos experimentos foram diluídas em tampão de amostra contendo 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol e 0,005% azul de bromofenol. Foi utilizado gel de empilhamento contendo acrilamida 4%, 0,0625 M TrisHCl, pH 6,8, 5 µL de TEMED, persulfato de amônio 0.05% (m/v), 0,0625% Nonidet P40 (v/v). A concentração do gel separador foi de 7,5% de acrilamida (acrilamida/bis 9/0,24), 0,45 M TrisHCl, pH 8,8, 5 µL de TEMED, 0,05% persulfato de amônio (m/v), 0,025% Nonidet P40 (v/v). As eletroforeses foram realizadas a 100 V por 4 horas, em tampão contendo Tris base e glicina (tampão 1x: Tris 3 g/L; glicina 14,4 g/L), em um sistema de minigéis BioRad.

4.22. Reação de uridililação da proteína PII de *A. brasilense*

As reações de uridililação foram realizadas utilizando a proteína GlnD de *A. brasilense*, parcialmente purificada gentilmente cedida pela Dr^a Maria Luiza de Araújo (ARAÚJO, 2003).

O sistema de reação de uridililação continha tampão de uridililação (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 25mM), 2-oxoglutarato 5mM e ATP 1mM, UTP 1mM, 3µg de PII nativa (trimérica) 0,1 µM de His-GlnD de *A. brasilense*.

As reações foram incubadas por 30 minutos a 30°C e interrompidas pela adição de 5µL de tampão de amostra (0,5 M TrisHCl pH 6,8, 10% de glicerol, e 0,05% (m/v) Azul de bromofenol e 0,5 µL de EDTA 0,5 mM pH 8,0). Todo o volume da reação foi aplicado em gel 7,5% e submetidas à eletroforese nativa, como descrito no item 4.21. Os géis foram corados com Coomassie blue ou prata.

4.23. Western Blot

Amostras a serem analisadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante utilizando o método descrito por LAEMMLI (1970) (item 4.10). Após a corrida, o gel foi equilibrado no tampão cátodo (C – 0,025M Tris pH10; 20% metanol; 0,04M ácido capróico). A membrana de PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare) foi previamente ativada em metanol. O sistema foi montado num aparato de transferência semi-seco. A placa do ânodo foi inicialmente coberta com 3 camadas de papel filtro previamente imersas em tampão A1 (0,3M Tris pH10; 20% metanol). Uma camadas de papel filtro contendo tampão A2 (0,025M Tris pH10; 20% metanol) foram colocadas no sistema, seguido da membrana de PVDF previamente imersa no tampão A2. O Gel foi então colocado sobre a membrana sempre se tomando o devido cuidado para evitar bolhas de ar no sistema. Duas camadas de papel filtro contendo tampão C foram colocadas sobre o gel. Uma pipeta de vidro foi utilizada para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do catôdo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80mA por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (Rainbow- Invitrogen).

Todo o tratamento da membrana foi realizado em tampão TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi lavada com TBST e colocada incubada com 20mL de solução com o anticorpo primário em leite 1% TBST, sendo mantida sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente.

Os anticorpos primários utilizados, bem como as diluições, são descritos na tabela abaixo (Tabela 4).

TABELA 4 – ANTICORPOS E DILUIÇÕES

Anticorpo	Diluição	Fonte do anticorpo
Anti-NifH	1/5.000	Huergo <i>et al.</i> , 2005
Anti-GS	1/10.000	Wally Van Heeswijk

Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBST. A membrana foi incubada com 20mL de solução contendo o

anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase – GE Healthcare) na diluição de 1/5.000 a temperatura ambiente por 1 hora. Após 3 etapas de lavagens com TBST (3X de 5 minutos), a membrana foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados e revelado em filmes de raio-X (BioMax – GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante.

4.24. Ensaio de atividade de DraG

A atividade da enzima DraG foi testada de duas maneiras: substrato sintético ou substrato natural.

A reação com substrato sintético análogo a nitrogenase foi realizada com dansil-arginina-ADP-ribose (DAAR), obtido da reação de uma arginina-dansilada com um NAD^+ e a toxina da cólera e gentilmente cedido por Victor E. P. Souza (SOUZA, 2010). Reações de 10 μL foram montadas contendo tampão de reação (concentração final: Tris-HCl pH8 50 mM; NaCl 100 mM; MgCl_2 20 mM; LDAO 0,05%; ADP 1 mM; BSA 1 $\mu\text{g}/(\mu\text{L de reação})$), diferentes concentrações de DraG e 2 μL de DAAR (concentração inicial 208 μM). O tempo zero (controle) consistiu do mesmo sistema, mas sem adição de DraG. As reações foram iniciadas com a adição de DAAR e incubadas a 30°C por diferentes tempos (conforme indicado). As reações foram paradas com 1 μL de EDTA 500 mM e em seguida, 1 μL da reação foi aplicado em duplicata em uma placa de sílica onde foi corrida uma TLC. A TLC foi corrida em n-butanol:ácido acético:água 4:1:2. Após a corrida, a placa foi analisada através de exposição a luz UV 365 nm. Ao ocorrer a reação de hidrólise, ADP-Ribose e dansil-arginina são separados, o aparecimento de danil-arginina livre é indicativo da atividade de DraG. A quantidade de dansil-arginina liberada foi quantificada a partir da comparação com curva padrão de dansil-arginina (linearidade de 1 a 7 μM).

Uma vez determinada a melhor concentração de DraG, os ensaios foram realizados com 5 ng de DraG, 800 ng de GlnZ ou GlnZ $\Delta 42-54$ ou 3 μg de AmtB + 800ng de GlnZ (para cada 10 μL de reação). O tempo utilizado para quantificação foi

de 5 minutos de reação a 30°C, sendo que a reação foi linear no intervalo de 2 a 10 minutos.

A fim de se verificar se a formação do complexo DraG-GlnZ altera a atividade glicohidrolase de DraG sobre NifH-ADP-ribosilada, um ensaio foi desenvolvido para monitoramento da atividade de DraG a partir da observação do desaparecimento da banda correspondente à proteína NifH ADP-ribosilada (NifH-ADPR) por western blot.

Primeiramente os ensaios foram realizados apenas com DraG e NifH semi-purificada (item 4.17). Para análise de cada tempo 10 µL de reação foram coletados nos tempos 2, 5 10 e 20 minutos ou como indicado nos experimentos. As reações continham tampão de reação (concentração final: Tris-HCl pH8 50 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 20 mM; LDAO 0,05%; ADP 1mM), 1,6µg de NifH semi purificada para cada 10 µL de reação e diferentes concentrações de DraG. O tempo zero (controle) consistiu do mesmo sistema, mas sem adição de DraG. Os tubos com as reações foram incubados a 30°C e as reações foram paradas com tampão de amostra para SDS-PAGE contendo EDTA para garantir a inativação da enzima DraG. Depois de coletados todos os tubos, as amostras foram aquecidas por 1 minuto a 100°C e aplicadas em gel “low cross-link” (acrilamida:bis 172:1) (KANEMOTO e LUDDEN, 1984) 12,5%. Após a corridas, as proteínas foram transferidas para membrana por western blot (4.23) e reveladas com anticorpo Anti-NifH.

Uma vez determinada a melhor concentração de DraG, os ensaios foram realizados na ausência ou presença de GlnZ ou GlnZ Δ 42-54 ou GlnZ-AmtB em diferentes concentrações, conforme descrito nos ensaios.

4.25. Cultivo de célula de *A. brasilense* selvagem (FP2) para extração de metabólitos e determinação do desligamento-religamento da nitrogenase

As células de *A. brasilense* FP2 foram cultivadas conforme descrito no item 4.4. Após a determinação da atividade da nitrogenase, as células foram plaqueadas em meio NFb lactato sólido, contendo antibiótico, e incubadas a 30°C por 3 dias para contagem do número de células. A contagem de células é utilizada para determinar a concentração molar dos metabólitos analisados (itens 4.27 e 4.28).

Para a extração de metabólitos, alíquotas de 2 ou 15 mL foram rapidamente coletadas, sob agitação, nos tempos -5, 0, 1/2, 1, 2, 5, 10 e 20 minutos, sendo o tempo -5 anterior ao choque de amônio (200 μ M de NH_4Cl) e o tempo 0 imediatamente anterior ao choque. Logo após coletadas, as amostras foram resfriadas em nitrogênio líquido por 10 segundos e mantidas em gelo até o processamento. Em paralelo, para se analisar a modificação pós-traducional das proteínas GS e NifH, 33 μ L da cultura de *A. brasilense* fixando nitrogênio foram coletadas nos tempos indicados anteriormente, misturados rapidamente com 17 μ L de tampão de amostra para eletroforese de proteínas 3X concentrado. A mistura foi congelada em nitrogênio líquido sendo então armazenada a -80°C .

As alíquotas de 2 e 15 mL foram processadas conforme descrito no item a seguir. As alíquotas de 33 μ L fervidas por 1 minuto, centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, 6 μ L do sobrenadante foram aplicados em gel de proteína. A concentração dos géis de acrilamida foram de 7,5% para GS e 12,5% para NifH. Para NifH, utilizou-se gel de acrilamida “low cross-link” (acrilamida:bis 172:1) (KANEMOTO e LUDDEN, 1984). Em seguida foram submetidas a western blot, como descrito acima (4.23) e reveladas com Anti-NifH e Anti-GS.

4.26. Extração dos metabólitos para determinação da concentração intracelular de ADP, ATP, 2-OG, Glutamina e Glutamato

A metodologia utilizada para extração de metabólitos foi adaptada da metodologia proposta por Bennett e colaboradores (2009). As amostras coletadas no item 4.25 foram centrifugadas por 2 minutos a 20.000 x g, a 4°C (2 mL) ou 5 minutos a 5000 rpm, a 4°C (15mL) e os pellets foram coletados e processados. Para o processamento, os pellets foram ressuspensos em 60 μ L (2 mL) ou 500 μ L (15 mL) de tampão de extração gelado – -20°C (acetonitrila:metanol:água 40:40:20 e ácido fórmico 0,1 M – o ácido é utilizado para garantir a desnaturação rápida e completa de proteínas) e mantidos por 20 minutos a -20°C . Logo em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 20.000 x g a 4°C e o sobrenadante transferido para um tubo novo. Ao pellet, adicionou-se novamente 60 ou 500 μ L de tampão de extração, e repetiu-se o processo anterior, misturando-se os dois

sobrenadantes obtidos. O sobrenadante combinado foi neutralizado para pH ~8,0 com 4 ou 33 μ L de hidróxido de amônio para evitar a degradação de metabólitos por ácido. Os tubos foram então novamente centrifugados para remoção de possíveis partículas em suspensão (20.000 x g, 20 minutos, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para análise LC-MS.

4.27. Análise dos metabólitos por LC-MS

4.27.1. Padronização de metabólitos

Soluções padrão dos metabólitos analisados foram preparadas frescos, na concentração de 1 mM em água ultrapura e aplicadas inicialmente por injeção direta com fluxo de 0,2 mL/min para determinação da relação massa/carga (m/z) de cada molécula e otimização das condições de ionização. Foram injetadas soluções de ADP, ATP, 2-OG, glutamina, glutamato, AMP, ADP-Ribose, NADH, NAD⁺, NADP e NADPH isoladamente. Em seguida, soluções de ADP, ATP e 2-OG foram misturadas em concentração final de 1 mM de cada metabólito e separadas por cromatografia líquida para determinação dos tempos de retenção (RT) e verificação de possível sobreposição dos espectros. Não ocorreu sobreposição no tempo de retenção sendo possível uma separação satisfatória desses metabólitos, soluções padrão da mistura ADP/ATP/2-OG nas concentrações 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 35, 50, 75 e 100 μ M foram analisadas em duplicata como descrito a seguir para determinação do limite de detecção (mínimo) e limite de linearidade. Para os metabólitos glutamina e glutamato, foram analisadas as concentrações 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 250, 350, 500 e 1000 μ M. Uma vez determinado o limite de linearidade para cada um dos compostos, foram construídas curvas padrão para posterior quantificação das amostras. As curvas obtidas para ATP, ADP, 2-OG e glutamato foram lineares, enquanto a curva obtida para glutamina foi de função quadrática.

4.27.2. Cromatografia líquida acoplada a MS – LC-MS

A separação dos metabólitos foi realizada em um equipamento UFLC Prominence (Shimadzu). As fases móveis foram compostas de ácido acético 15mM e tributilamina 10mM (A) e metanol (B). A separação dos metabólitos ocorreu em coluna XR-ODS ShimPack (30 mm de comprimento X 3 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 2,2 µm) mantida sob temperatura fixa de 40°C. As amostras foram alíquotadas em *vials* e mantidas no auto-injetor a 4°C. 10 µL de amostra foram injetados por corrida num fluxo de 0,2 mL/min. As corridas foram realizadas em duplicata ou triplicata. O gradiente utilizado foi linear com concentração de B crescente, num intervalo de 30 minutos (0,01' 0%B, 30' 100% B) seguido de 10 minutos de lavagem com tampão A. A pressão máxima foi fixada em 150 Kgf/cm₂.

4.27.3. Detecção dos metabólitos por Espectrometria de Massa

A quantificação dos metabólitos foi realizada em um espectrômetro de massas de alta resolução MicrOTOF-Q IITM (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) equipado com fonte de ionização electrospray ortogonal. O modo utilizado foi o modo negativo. O intervalo de aquisição de cada espectro foi de 50 a 1000 m/z com aquisição de 1 espectro por segundo. A voltagem do capilar foi mantida a 3.500 V e a voltagem na placa terminal (*end plat offset*) foi de -500 V. O fluxo de gás nebulizador foi de 2,0 bar e o fluxo do gás de secagem de 6,0L/min a 180°C. Antes de cada análise o equipamento foi calibrado em modo “enhanced quadratic” com uma solução de formiato de sódio 0,1 M. Nestas condições parte do ATP foi convertida em ADP durante o processo de ionização (*in source fragmentation*), entretanto, isto não ocasionou problemas de quantificação uma vez que ATP e ADP foram efetivamente separados durante a cromatografia líquida apresentando tempos de retenção distintos. Como gás nebulizador e gás de secagem foi utilizado gás nitrogênio produzido em um gerador de nitrogênio *peak scientific* acoplado ao espectrômetro. O fluxo volumétrico de entrada de amostra na fonte foi de 0,2 mL/min e não foi realizado *split* (descarte de parte da amostra) após passagem pela coluna.

4.27.4. Análise dos dados obtidos

As amostras foram analisadas inicialmente no programa DataAnalysis (versão 2.0 SP1 – Bruker) para verificação da m/z e tempo de retenção (RT). Os metabólitos foram analisados por extração do íon de interesse (usando a opção *base peak chromatogram*) com janela de erro de $0,05 \pm 0,01$ da relação m/z obtida com injeção direta dos metabólitos. Posteriormente, os metabólitos foram analisados no programa QuantiAnalysis (ESI compass 1.3 para micOTOF versão 4,0 SP1 Bruker). Foram construídas curvas padrões para cada um dos metabólitos analisados e determinada a concentração das amostras de acordo com a área obtida para o pico extraído para cada metabólito. A concentração intracelular foi calculada com base no número de células coletadas (número de células por mL X volume coletado) e no volume intracelular de *A. brasilense* ($2,356 \mu\text{m}^3$ - $1 \mu\text{m}$ diâmetro x $3 \mu\text{m}$ altura).

4.28. Dosagem enzimática de 2-OG

4.28.1.Extração de 2-OG

A dosagem enzimática de 2-OG foi realizada conforme Radchenko, Thornton, Merrick (2010). Células de *A. brasilense* FP2 foram crescidas e coletadas conforme descrito no item 4.26, exceto que o metabolismo foi parado com o tampão de extração. Dois mililitros de células foram coletados em duplicata e centrifugados por 30s a 13000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 120 μL de tampão de extração (HClO_4 0,3M; EDTA 1mM) a 0°C . Os tubos foram vortexados e mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos, sendo em seguida centrifugados por 1 minuto a 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e a ele foi adicionado 18 μL de K_2CO_3 2M para neutralização do ácido. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm para remoção dos precipitado KClO_4 e o sobrenadante foi analisado por ensaio fluorimétrico.

4.28.2. Ensaio Fluorimétrico

A concentração de 2-OG foi quantificada por ensaio com a enzima Glutamato desidrogenase, através da conversão de 2-OG a glutamato, com oxidação de NADH a NAD⁺, sendo o desaparecimento de NADH monitorado. A reação foi montada em placa de 96 poços preta. A reação utilizada foi:

60 µl 0,5M Imidazol (0,5 M imidazol; 0,5 M ácido acético)

30 µl 0,625M Acetato de Amônia

7,5 µl 0,4mM NADH

100 µl amostra ou padrão

102,5 µl H₂O.

A curva padrão utilizada foi de 1 a 50 µM de 2-OG. A fluorescência do NADH foi medida no espectrofluorímetro TECAN (excitação 340 nm e emissão 460 nm). Foi realizada uma leitura de fluorescência e em seguida adicionado 10 µl da enzima glutamato desidrogenase (0,001 g/mL) e realizada nova leitura. Os valores de fluorescência utilizados para quantificação foram obtidos pela extração da fluorescência inicial menos a final.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção das proteínas mutantes

Sabe-se que DraG interage com GlnZ mas não com GlnB, e que DraT interage com GlnB mas não com GlnZ, embora essas duas proteínas sejam altamente similares (81% de similaridade - Figura 3). Com a finalidade de identificar regiões estruturais das proteínas PII envolvidas na especificidade de interação com DraT e DraG foram construídos uma série de mutantes pontuais em aminoácidos localizados na superfície das proteínas PII. As proteínas mutantes foram construídas antes da obtenção da estrutura do complexo DraG-GlnZ com alteração em aminoácidos que diferiam entre GlnZ e GlnB em regiões de possível interação com DraG e DraT. A escolha das regiões mutagenizadas se baseou, inicialmente, no pressuposto de que DraG pode formar um complexo ternário com AmtB e GlnZ e como a ligação GlnZ-AmtB é dependente da região do *loop* T, a ligação DraG-GlnZ deveria ocorrer pela região oposta. Desse modo, foram construídas proteínas GlnZ mutantes nos resíduos 68, 69 e 95 por se localizarem na superfície da proteína GlnZ em região oposta à região do *loop* T e por serem os únicos resíduos expostos nessa região que diferiam entre GlnZ e GlnB, onde inicialmente se esperava que ocorresse a interação DraG-GlnZ. Para isso, as proteínas mutantes GlnZ D68S, D68S/D69Q, D95P, D68S/D95P e Δ 42-54 foram construídas e gentilmente cedidas por Marcelo Scarduelli. A mutante GlnZ Q69L foi construída durante o desenvolvimento desse trabalho por mutagênese sítio dirigida e confirmada por sequenciamento (dados não mostrados).

A interação DraT-GlnB provavelmente ocorre pela região do *loop* T de GlnB. Para confirmar essa hipótese, foram construídas as mutantes GlnZ Q42H/S52V/S54D, S52V/S54D e GlnB H42Q e Δ 42-54. Foram construídas ainda duas proteínas quiméricas, BZ (1-92 GlnB, 93-102 GlnZ) e ZB (1-48 GlnZ, 49-102 GlnB) para avaliação da participação das regiões C- e N-terminal de GlnZ e GlnB nas interações DraT-GlnB e DraG-GlnZ e duas proteínas mutantes no resíduo Q39 – GlnZ Q39E e Q39K para investigação da participação desse resíduo na ligação de

efetores em *A. brasilense*. Todas essas proteínas foram construídas e gentilmente cedidas por Marcelo Scarduelli.

5.2. Purificação de proteínas

As proteínas His-DraG, His-DraT, His-AmtB, DraG, GlnZ e GlnB foram purificadas conforme descrito na metodologia, com obtenção de concentração e pureza adequadas para os experimentos realizados neste trabalho.

5.2.1. Purificação das proteínas mutantes PII

As proteínas PII de *A. brasilense* mutantes GlnZ (D68S; Q69L; D68S-Q69L; Q39K; S52V-S54D; Q42H-S52V-S54D; D95P; D68S-D95P, Δ 42-54), GlnB (H42Q e Δ 42-54) e quimera ZB de *A. brasilense* foram expressas a partir do vetor pET28a em *E. coli* BL21 em 400 ml de meio LB e induzidas por IPTG durante a noite, a 20°C. As mutantes GlnZ D68S Q69L e Δ 42-54 foram as primeiras a serem purificadas e por isso não foram submetidas a etapa de aquecimento antes da purificação, por não se saber qual seria o seu comportamento. As demais mutantes foram testadas quanto a essa etapa em pequena escala, com expressão em 10 mL antes da expressão para purificação, não apresentando problemas quanto à solubilidade em razão do aquecimento e sendo então purificadas conforme as proteínas nativas. A purificação foi realizada em coluna de heparina (HiTrap) de 1 mL acoplada a bomba peristáltica. A eluição foi realizada com tampão KCl (Tampão A: 10 mM KCl, tampão B: 1 M KCl; concentrações de eluição: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 60% de B, 2 ml de cada tampão). Todas as proteínas mutantes se mostraram solúveis, sendo purificadas da mesma forma que as proteínas nativas (figura 7). Todas as proteínas mutantes foram eluídas entre 25 e 30% de tampão B, assim como as proteínas nativas. A quimera BZ purificada foi gentilmente cedida por Marcelo Scarduelli. Já a quimera ZB foi apenas parcialmente purificada, pois ela não se ligou à coluna de heparina como os demais mutantes.

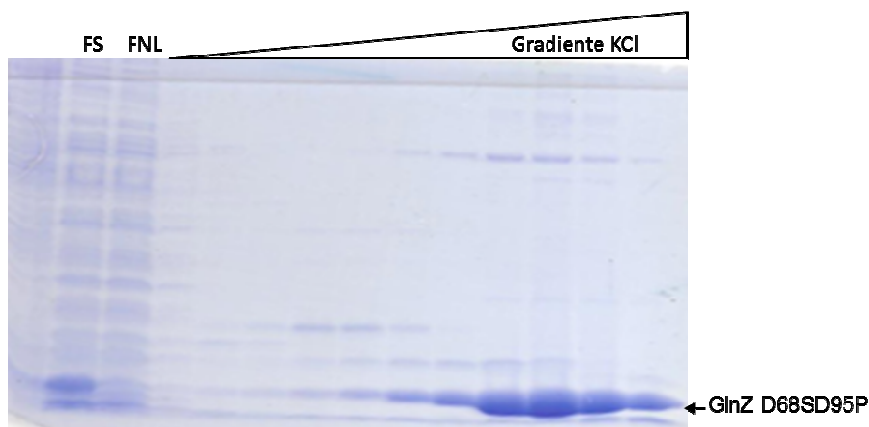


Figura 7 – Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação de proteína GlnZ mutante. GlnZ D68S D95P. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5%. FS – fração solúvel após sonicação. FNL – fração de lavagem (não ligada à coluna). Todas as proteínas mutantes purificadas apresentaram perfil eletroforético semelhante, com exceção da proteína mutante GlnZ Δ 42-54 que apresentou além da banda equivalente aos monômeros (~12 KDa), uma banda equivalente à proteína trimérica em razão do não aquecimento da amostra antes de ser aplicada no gel. Frações foram eluídas da coluna HiTrap Heparina, com gradiente de KCl. Gel corado com Coomassie Blue.

Para todas as proteínas purificadas, as frações contendo mais proteína e menos contaminantes foram reunidas e dialisadas, dosadas quanto ao teor proteico, aliquotadas e armazenadas a -20°C . Aliquotas contendo 5 μg de proteínas foram aplicadas em gel SDS-PAGE para verificação da presença de contaminantes (Figura 8).

Alguns mutantes apresentaram alguns contaminantes após a purificação. A análise densitométrica é mostrada na tabela 5. Todas as proteínas mutantes apresentaram pureza superior a 75%.

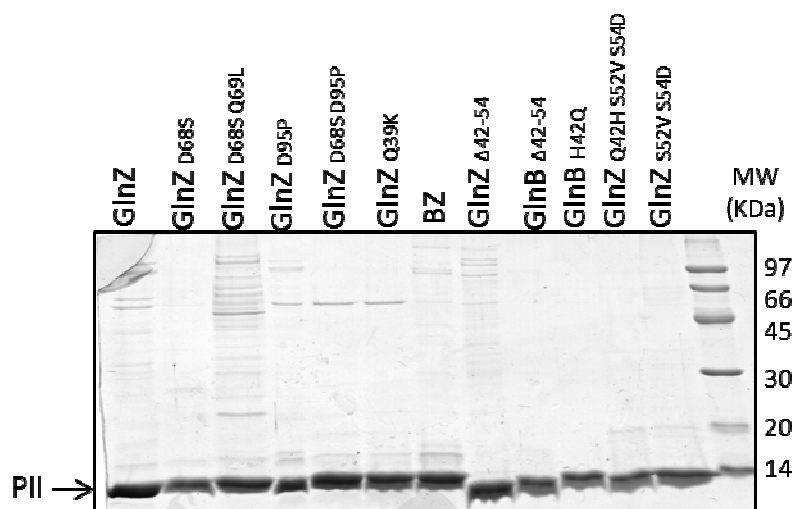


Figura 8 – Perfil eletroforético das frações contendo as proteínas purificadas após diálise. 5µg de cada proteína PII purificada foram aplicadas em gel SDS-PAGE gel 12,5%. O gel foi corado com Coomassie Blue.

TABELA 5 – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS PROTEÍNAS PII PURIFICADAS.

Proteína	Pureza (%)
GlnZ	86,7
GlnZ D68S	95,7
GlnZ D68S Q69L	76,3
GlnZ D95P	81,3
GlnZD68S D95P	91,6
GlnZ Q39K	90,8
BZ	89
GlnZ Δ42-52	83,2
GlnB Δ42-52	98,7
GlnB H42Q	99,3
GlnZ Q42H S52V S54D	91,9
GlnZ S52V S 54D	95,3

5.2.2. Análise da conformação das proteínas mutantes através de gel nativo

Para se verificar se as proteínas mutantes obtidas apresentavam conformação semelhante à proteína nativa, elas foram analisadas em eletroforese não desnaturante (Figura 9 e Figura 24). Todas as proteínas mutantes apresentaram padrão de migração esperado para conformação nativa de homotrímero, sugerindo que as mutações introduzidas não afetam a trimerização da proteína. As proteínas mutantes GlnZ D68S Q69L, GlnZ D68S, GlnZ Δ42-54, GlnZ Q39K, GlnZ D95P, GlnZ D68S D95P e GlnB Δ42-54 , migraram menos que a proteína GlnZ nativa. Isso era

esperado uma vez que no gel nativo as proteínas migram de acordo com as cargas que possuem, migrando do polo negativo para o positivo. GlnZ D68S Q69L, GlnZ D68S e GlnZ D95P possuem uma carga negativa a menos no pH de corrida (8,8) por monômero em relação a proteína nativa, pois tiveram a substituição de um aminoácido negativo (aspartato) por um sem carga (leucina, serina e prolina, respectivamente). Já a proteína mutante Q39K teve a alteração de um aminoácido sem carga (glutamina) por um positivo (lisina). Assim esses mutantes apresentam uma migração um pouco menor que a proteína GlnZ nativa. A quimera BZ aparentemente migra mais que as proteínas nativas, assim como as proteínas mutantes GlnZ Q42H V52S V54D e GlnZ V52S V54D (figura 24) que apresentam uma carga negativa a mais no pH de corrida que as proteínas nativas (aspartato substituindo valina). As proteínas PII nativas (GlnZ e GlnB) tem um perfil de migração semelhante, e este mesmo perfil foi apresentado pela proteína mutante GlnB H42Q (figura 24).

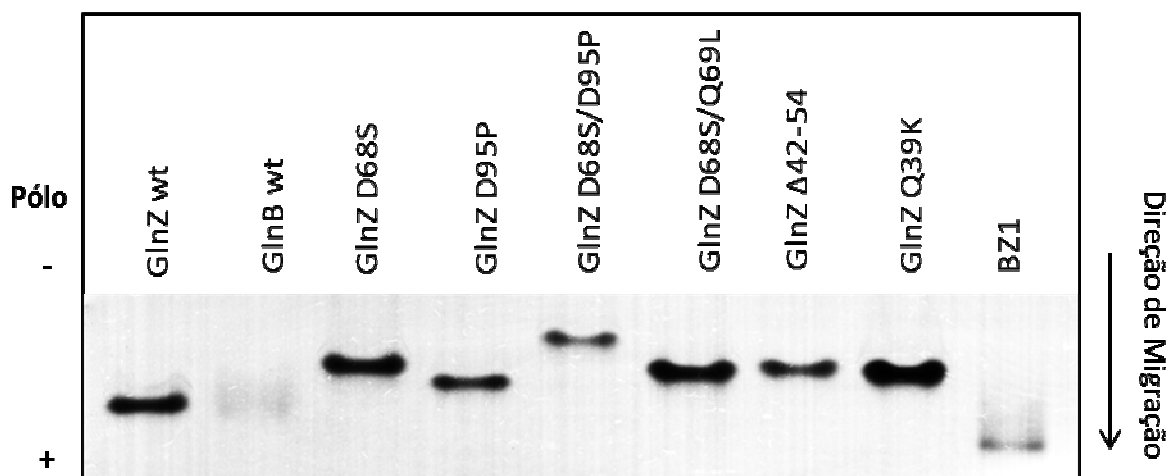


Figura 9 – Perfil eletroforético das proteínas mutantes PII em gel nativo. 3µg das proteínas PII nativas ou mutantes foram aplicadas em gel nativo 10%. Gel foi corado com Coomassie Blue.

5.3. Ensaios de interação (co-precipitação) das proteínas PII com DraG-His e AmtB-His

As proteínas mutantes PII obtidos foram analisados quanto à capacidade de interação com DraG (Figura 11), AmtB (figura 12) e DraT (Figura 16) *in vitro*.

Os ensaios de co-precipitação foram realizados na presença dos efetores ADP ou ATP. Ensaios com *E. coli* e *A. brasilense* (COUTTS *et al.*, 2002; HUERGO *et al.*, 2006, 2007) indicam que as proteínas PII interagem com AmtB e DraG quando na presença de ADP.

Os ensaios de interação foram realizados com *beads* magnéticos carregados com níquel (MagneHis-Ni²⁺, Promega). Devido à presença do níquel, as proteínas contendo cauda His (6 histidinas) podem se ligar com alta afinidade a esses *beads*, e uma vez que sejam adicionadas proteínas com a capacidade de interagir com estas proteínas ligadas, as duas proteínas (com e sem cauda His) podem ser co-precipitadas. Após a adição das proteínas com cauda His e PII, a reação ocorreu por 5 minutos e em seguida, os *beads* foram lavados 3 vezes com o tampão de reação para evitar ligações inespecíficas. As proteínas PII nativas e mutantes foram testadas quanto a interações inespecíficas com a resina e não têm capacidade de interagir com a resina, sendo co-eluídas apenas quando são capazes de interagir com a proteína His ligada à resina. A única exceção foi a proteína mutante GlnZ Q39E que, por interagir com a resina, não foi testado em ensaios de co-precipitação.

Nos ensaios de interação (Figuras 11 e 12), verificou-se que, na presença de ADP, DraG interage com GlnZ (controle positivo) mas não com GlnB (controle negativo) e GlnZ e GlnB interagem com AmtB, confirmando dados anteriores (HUERGO *et al.*, 2007). Todas as interações observadas foram na presença de ADP 1mM, não sendo detectada nenhuma interação na presença de ATP (figura 12 - AmtB e dados não mostrados - DraG). Dados de Huergo e colaboradores (2007) mostram que a interação AmtB-GlnZ pode ocorrer com ATP. Porém os dados aqui obtidos e obtidos por Rodrigues e colaboradores (2011) indicam que esta interação ocorre apenas na presença de ADP. Estes resultados foram confirmados em diferentes preparações de AmtB e GlnZ. Em um estudo recente com AmtB/GlnK de *E. coli*, também foi observada interação apenas na presença de ADP (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010), embora este mesmo grupo previamente tivesse reportado que esta interação ocorria também na presença de ATP. De acordo com os autores, essa interação na presença de ATP poderia ter ocorrido por hidrólise do ATP por alguma ATPase contaminante. A mesma explicação pode ser utilizada para os dados obtidos por Huergo e colaboradores, 2007 (RODRIGUES *et al.*, 2011)

A ligação de efetores, como descrito anteriormente, leva a uma alteração conformacional da PII que pode favorecer ou prejudicar a estabilidade do complexo formado. Para a interação DraG-GlnZ, a presença de ADP favorece a formação do complexo, isso porque os resíduos 38 e 40 da GlnZ (localizados na base do *loop* T) estão envolvidos na interação DraG-GlnZ, estes resíduos apresentam conformações diferenciadas quando ADP ou ATP estão ligados à GlnZ (RAJENDRAN *et al.*, 2011; figura 10). Já para que a interação AmtB-GlnZ ocorra é de extrema importância a conformação estendida do *loop* T (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). Quando na presença de ADP, Q39 e K58 interagem entre si, e por estarem localizados próximos a base do *loop* T, levam a alteração da conformação do *loop* T de PII (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; TRUAN, *et al.*, 2010) favorecendo a interação com AmtB.

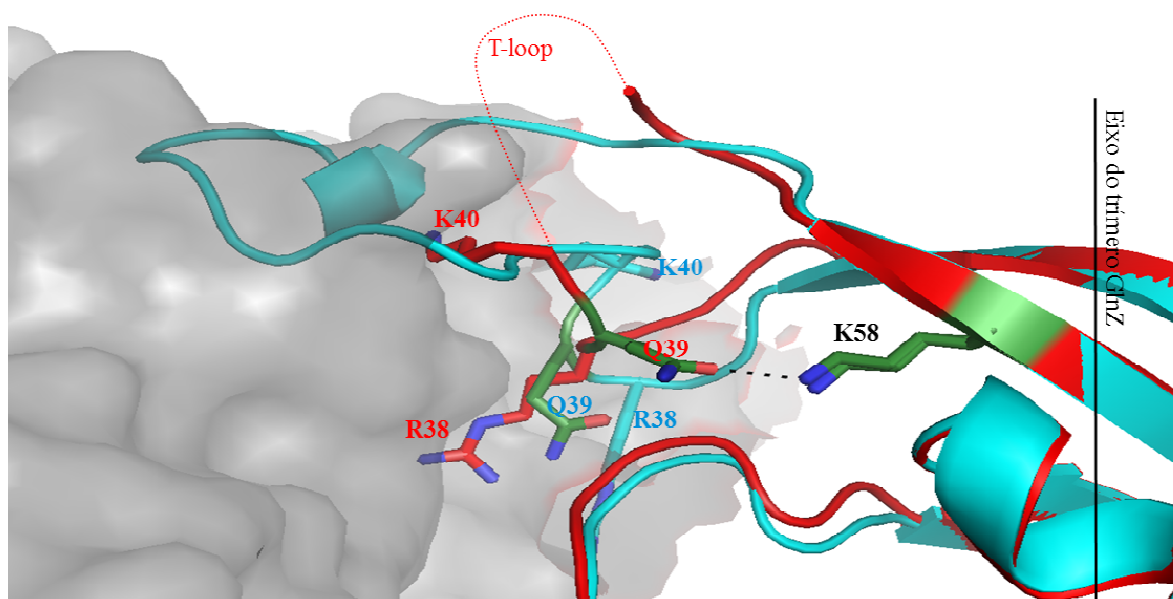


Figura 10 – Representação da interface DraG-GlnZ. Sobreposição de GlnZ-ADP (vermelho) e GlnZ MgATP 2-oxoglutarate (azul) de *A. brasilense*. A superfície da DraG está representada em escala de cinza. Resíduos Q39 e K58 estão marcados em verde. A parte desordenada do *loop* T GlnZ está representada como linha pontilhada vermelha. Linha pontilhada em preto indica interação iônica entre Q39 e K58 na presença de ADP. Fonte da figura: L.F. Huergo.

A proteína mutante GlnZ Q69L (dado não mostrado) e a dupla mutante GlnZ D68S Q69L perderam a interação com DraG (Figura 11) na presença de ADP, enquanto a proteína mutante simples D68S (Figura 11) e a dupla D68S D95P (Figura 11) continuam interagindo, embora essa interação seja menor que a observada a proteína nativa, (note na figura 11 que a intensidade de GlnZ co-precipitada para estas mutantes é menor em relação a GlnZ selvagem). Estes dados

indicam que os aminoácidos 68 e 69 estão envolvidos na interação DraG-GlnZ. Já as proteínas mutantes GlnZ D95P, GlnZ Q42H S52V S54D e GlnZ S52V S54D co-precipitaram com His-DraG de forma semelhante a GlnZ nativa, indicando que a alteração desses aminoácidos não altera a formação ou a estabilidade do complexo DraG-GlnZ. As proteínas mutantes GlnZ Q69L, D68S e D68S Q69L foram construídas por diferirem entre GlnZ e GlnB e estarem localizados na interface de ligação GlnZ-DraG com base na análise da estrutura do complexo. As proteínas mutantes D95P e D68S D95P foram construídas devido à suspeita de que DraG se ligaria a face oposta do *loop* T na GlnZ. Todas essas mutantes interagiram normalmente com AmtB (Figura 12) na presença de ADP, não sendo detectada interação na presença de ATP, indicando que as proteínas mantêm sua conformação e sítio de ligação a ADP funcionais.

A quimera BZ não interage com DraG (figura 11), mas sim com AmtB (figura 12). Essa quimera apresenta a região N-terminal da proteína GlnB (1-91) e a região C-terminal da proteína GlnZ (92-112). Essa não-interação com DraG indica que a região N-terminal é importante para a interação GlnZ-DraG. A quimera ZB (GlnZ 1-48; GlnB 49-112) também não apresentou interação com DraG. Esses dados reforçam a importância dos resíduos 68 e 69, pois em ambas quimeras, estes dois resíduos são da proteína GlnB (S e L, respectivamente).

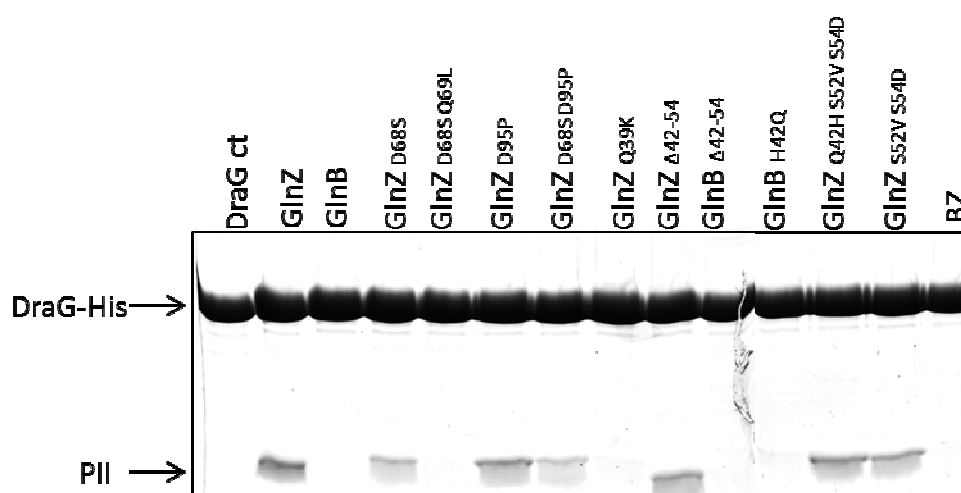


Figura 11 – Ensaio de interação (co-precipitação) DraG-Pil. 10µg DraG-His e 10µg de cada uma das proteínas Pil foram adicionadas em tampão contendo ADP 1mM. DraG ct corresponde ao controle, sem adição de Pil. Depois de três lavagens, a eluição foi realizada com tampão de amostra (contendo SDS e β-mercaptoetanol) e as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% coradas com Coomassie Blue.

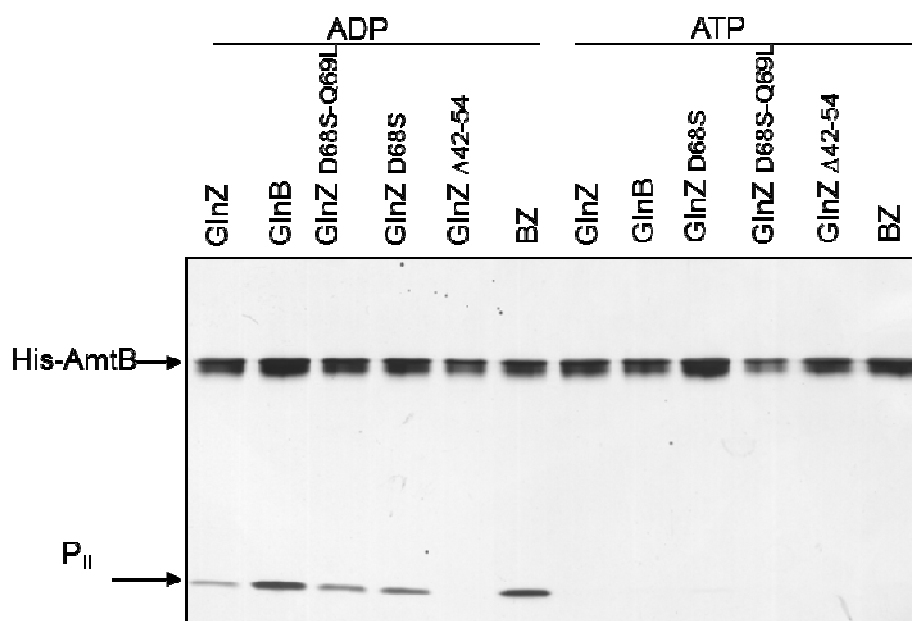


Figura 12 – Ensaio de interação (co-precipitação) AmtB-Pil. 10µg AmtB-His e 10µg de cada uma das proteínas Pil foram adicionadas a resina em tampão contendo ADP ou ATP 1mM. A eluição foi realizada com tampão de amostra (contendo SDS e β-mercaptoetanol) e as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com prata.

A estrutura cristalográfica do complexo DraG-GlnZ publicada recentemente (RAJENDRAN *et al.*, 2011) revelou que esta interação ocorre na estequiometria de 3 monômeros de DraG para 1 trîmero de GlnZ (figura 13 A), o que difere dos dados obtidos por Huergo e colaboradores (2007), onde por gel filtração, a estequiometria obtida foi de 1:1 (monômero DraG:trîmero GlnZ). A estrutura revelou ainda que cada monômero de DraG interage com dois monômeros de GlnZ (B e B') (figura 13 B), estando envolvidas com a interação os segmentos S1 (T21-I25), S2 (D68-V73) e C-terminal (R101-L112) de GlnZ-B e região N-terminal do *loop* T de GlnZ-B'. Os dados cristalográficos confirmam a participação dos resíduos D68 e Q69 de GlnZ interagindo com os resíduos H112 e R117 de DraG através de contato pela cadeia lateral (figura 14 - RAJENDRAN *et al.*, 2011). Além desses resíduos, estão também envolvidos na interação os resíduos G24, Q72, R103, E110 e L112 de GlnZ-B e K40 e R38 (base do *loop* T) de GlnZ-B'. Dentre os resíduos envolvidos, apenas D68, Q69, Q72, E110 e L112 diferem de GlnZ para GlnB (S68, L69, R72, D110 e I112), provavelmente E110/D110 e L112/I112 apresentam as mesmas características de interação e provavelmente não afetam a formação do complexo. Logo, a especificidade da interação DraG-GlnZ é oriunda da interação com os resíduos D68, Q69 e Q72, localizados no segmento S2 da GlnZ. Os dados cristalográficos revelaram ainda que T21 e L23, que estão localizados em S1, também contribuem

para a especificidade DraG-GlnZ pois a substituição desses resíduos pelos equivalentes em GlnB (H21 e V23) causaria perturbação das forças de van der Waals locais gerando desordem nessa região da proteína que está envolvida com a formação de um bolsão hidrofóbico que interage com M111 de DraG (RAJENDRAN *et al.*, 2011).

A elucidação da estrutura do complexo DraG-GlnZ confirma que esta interação ocorre pela face lateral de GlnZ, entre dois monômeros, de modo diferente das outras interações de proteínas PII e proteínas alvo conhecidas que ocorrem pelo *loop* T. A interação DraG-GlnZ deixa livre o *loop* T que está apto a interagir com AmtB, viabilizando a formação do complexo ternário DraG-GlnZ-AmtB conforme o modelo estrutural apresentado na Figura 15.

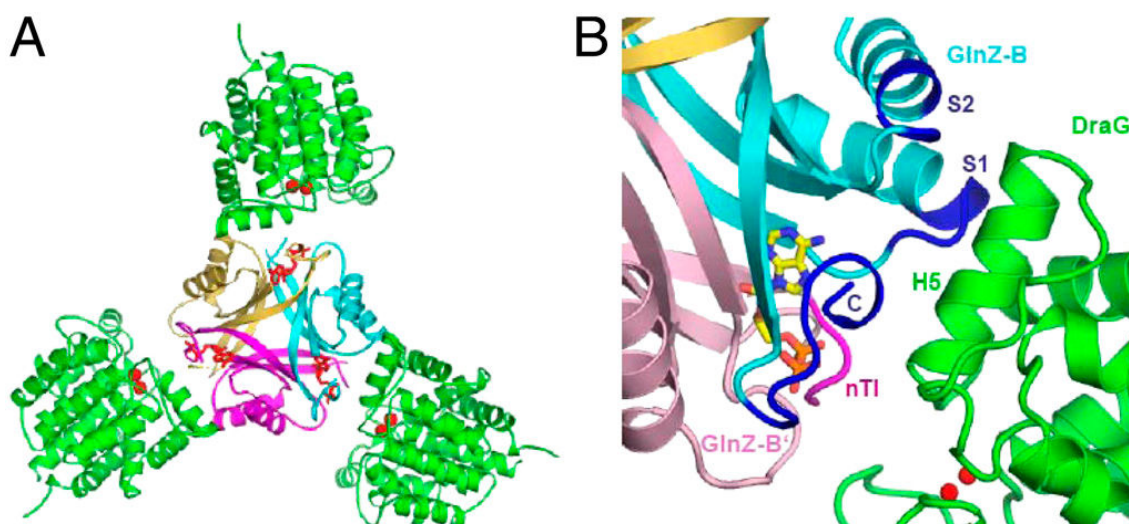


Figura 13 – Estrutura do complexo DraG-GlnZ. A - Representação dos três monômeros de DraG (verde) ligadas ao trîmero de GlnZ (amarelo, rosa e ciano). As moléculas de ADP ligadas às fendas laterais de GlnZ são mostradas em vermelho; íons Mg^{2+} ligados ao sítio ativo de DraG são mostrados como esferas vermelhas. B – Vista ampliadas da interface GlnZ-DraG envolvendo dois monômeros de GlnZ B e B' (ciano e rosa claro, respectivamente). DraG (verde) interage com segmentos S1, S2 e C do monômero GlnZ-B (regiões destacadas em azul escuro); região N-terminal do *loop* T de GlnZ-B' participa da interação (rosa escuro); ADP é mostrado em bastões amarelos. Fonte: RAJENDRAN *et al.*, 2011.

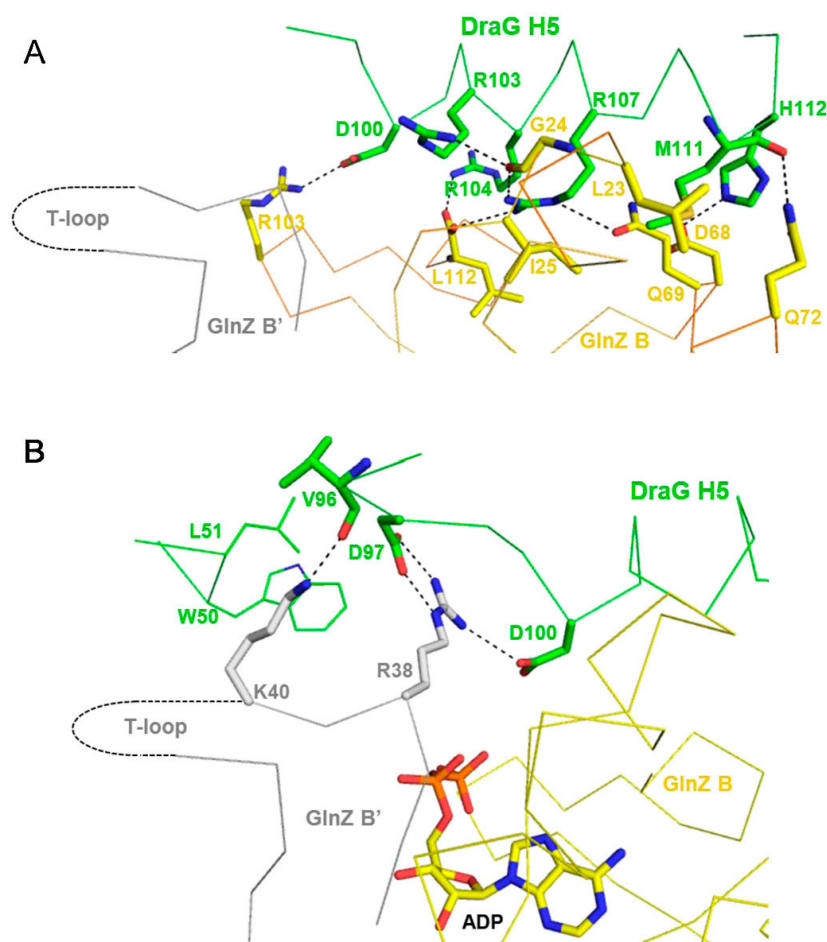


Figura 14 – Interações detalhadas entre GlnZ e DraG. Um monômero de DraG (verde) interage com dois monômeros de GlnZ (B e B'). Átomos da cadeia principal e/ou lateral dos resíduos envolvidos em pontes de hidrogênio ou ligações iônicas (linhas pretas tracejadas) são mostrados com representação de bastões. O loop T desordenado é mostrado como linha pontilhada. A – interações entre DraG – GlnZ-B (amarelo). O contatos hidrofóbicos de M111 também são mostrados. B – contatos entre DraG e GlnZ-B' (cinza). ADP ligado entre B e B' está representado por bastões amarelos. Fonte: RAJENDRAN *et al.*, 2011.

A proteína mutante GlnZ $\Delta 42-54$ tem quase todo o *loop* T deletado, mantendo três resíduos anteriores (38-40) e dois posteriores à região deletada, para que a proteína não sofresse alteração conformacional, e a conexão da proteína nessa região fosse mantida. De acordo com dados cristalográficos já obtidos para proteínas PII de outros organismos, sabe-se que a interação AmtB-GlnZ se dá pela região do *loop* T, enquanto a interação GlnZ-DraG ocorre pela face lateral do trímero de GlnZ (figura 15) mas com envolvimento dos aminoácidos K40 e R38 localizados na base do *loop* T (figura 14B). A proteína mutante GlnZ $\Delta 42-54$ apresentou interação com DraG mas não com AmtB, confirmando a necessidade do *loop* T para interação AmtB-GlnZ em *A. brasilense* (figuras 11 e 12). É importante notar que a interação DraG-GlnZ $\Delta 42-54$ parece ser mais forte que a interação DraG-GlnZ, pois

nos ensaios de co-precipitação, GlnZ $\Delta 42-54$ co-precipitou mais que GlnZ nativa (dados não mostrados) sugerindo uma interação mais estável. Possivelmente, a ausência do *loop* T, que é bastante flexível, diminuindo a entropia e aumentando a estabilidade dessa interação. Quando presente, a flexibilidade do *loop* T pode causar impedimento estérico para a interação DraG-GlnZ.



Figura 15 – Representação do complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG. Sobreposição AmtB-GlnK (PDB 2NUU – Conroy *et al.*, 2007) de *E. coli* e GlnZ-DraG de *A. brasilense* (PDB 3O5T- Rajendran *et al.*, 2011). Laranja – AmtB, Branco – DraG, Vermelho – ADP-GlnZ. Fonte da figura: L.F. Huergo.

Mutantes GlnZ Q39 foram construídos devido ao envolvimento desse aminoácido com a ligação de efetores e conformação do *loop* T (TRUAN *et al.*, 2010). Quando na presença de ADP, a cadeia lateral deste aminoácido está envolvida em uma ligação iônica com o resíduo K58, resultando em uma conformação do *loop* T que favorece a estabilização do complexo DraG-GlnZ (figura 10). Já quando ATP, 2-OG e Mg^{2+} estão presentes, este resíduo realiza coordenação com o íons Mg^{2+} gerando uma conformação do *loop* T que inviabiliza a formação do complexo DraG-GlnZ ou AmtB-GlnZ. Mutações nas proteínas GlnB, GlnK e GlnJ no aminoácido Q39 foram realizadas em *R. rubrum* (JONSSON e NORDLUND, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008) e em GlnB de *E. coli* (JIANG *et al.*, 1997) com a alteração da glutamina para glutamato (Q39E), onde a alteração desse aminoácido levou à diminuição na ligação de 2-OG (JIANG *et al.*, 1997) ou à insensibilidade à presença de MgATP-2-OG (TEIXEIRA *et al.*, 2008). A troca de

uma glutamina (polar sem carga) por um glutamato (carregado negativamente em pH fisiológico) poderia mimetizar a estrutura de GlnZ ligada a ADP, pois a carga negativa poderia formar uma interação iônica com o resíduo K58, estabilizando o *loop* T de maneira independente da ligação de efetores e permitindo a formação de complexos como DraG-GlnZ ou AmtB-GlnZ. Em *R. rubrum* o complexo GlnJ Q39E-AmtB1 foi detectado mesmo na presença de 1mM de 2-OG (TEIXEIRA *et al.*, 2008), reforçando que essa ligação poderia estabilizar a estrutura de forma favorável à interação. Esse mutante foi construído para *A. brasilense*, mas não pode ser testado nos ensaios de co-precipitação por interagir com a resina magnética.

Já na proteína mutante Q39K, ao se trocar uma glutamina por uma lisina, esperava-se que a ligação iônica com K58 fosse perdida (repulsão de cargas), assim como a coordenação com o íon metálico, também com carga positiva, necessário para a ligação de 2-OG. Nos ensaios de interação, a proteína mutante GlnZ Q39K não apresentou interação em nenhuma condição (ADP ou ATP), nem com DraG (Figura 12), nem com AmtB (dado não mostrado). O fato desse mutante não interagir com nenhuma das proteínas reforça a importância desse resíduo para resposta das proteínas PII aos efetores.

5.4. Interação da proteína His-DraT com proteínas PII nativas e mutantes

Os primeiros estudos sobre formação do complexo DraT-GlnB foram realizados *in vivo* e confirmaram a interação destas proteínas em *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2006b), *R. rubrum* (ZHU *et al.*, 2006) e *R. capsulatus* (PAWLOWSKI *et al.*, 2003). A primeira detecção desse complexo *in vitro* foi realizada por HUERGO e colaboradores em 2009. Eles observaram que a formação do complexo ocorria na presença de ADP ou ATP (quando na ausência de 2-OG), sendo que a presença de ADP estimulou a formação do complexo com GlnB desuridililada ou uridililada, enquanto ATP favoreceu a formação do complexo entre DraT e GlnB desuridililada apenas (HUERGO *et al.*, 2009). Ainda nesse trabalho, foi proposto que a interação dessas duas proteínas se dava pela região do *loop* T, sendo a interação é afetada pelo estado de uridililação do *loop* T. A mesma sugestão foi reforçada por Zhu e colaboradores (2006), onde mutantes GlnB em *R.*

rubrum nos resíduos do *loop* T foram testados utilizando um sistema de duplo híbrido e apresentaram interação diminuída com DraT.

A fim de confirmar essa hipótese, mutantes GlnZ foram construídos com alteração dos aminoácidos que diferem de GlnB para GlnZ na região do *loop* T assim como um mutante com deleção da região 42-54 de GlnB. As proteínas mutantes GlnZ Q42H S52V S54D e GlnZ S52V S54D possuem modificação nos únicos aminoácidos que diferem de GlnZ para GlnB na região do *loop* T (o *loop* T de GlnZ Q42H S52V S54D é idêntico ao de GlnB). Esses mutantes GlnZ passaram a interagir com His-DraT, embora tenham co-precipitado menos que GlnB, indicando interação menor que GlnB nativa e sugerindo que aminoácidos que não estão localizados na região do *loop* T também sejam importantes para que essa interação ocorra de forma estável. A proteína mutante GlnB V52D testado em *R. rubrum* confirma o envolvimento desse resíduo com a formação do complexo DraT-GlnB uma vez que ele perdeu quase totalmente a interação com DraT (ZHU *et al.*, 2006). A proteína mutante GlnB Δ 42-52 perdeu a capacidade de interagir com His-DraT (figura 16) e His-AmtB (dados não mostrados) confirmando a importância dessa região para que a interação ocorra com ambas as proteínas. A proteína mutante GlnB H42Q apresentou interação semelhante a GlnB, mas em *R. rubrum* este mutante teve a interação DraT-GlnB diminuída, indicando que o resíduo H42 participa desta interação (ZHU *et al.*, 2006). A quimera BZ interagiu de forma semelhante à proteína nativa. Esta quimera tem os resíduos 1-91 de GlnB e 92-112 de GlnZ, sendo toda a região N-terminal, incluindo o *loop* T, pertencente a GlnB. Assim, os resíduos 42, 52 e 54 são importantes para a ligação DraT-GlnB, embora outros aminoácidos externos ao *loop* T pareçam interferir nessa interação, seja por contato direto ou por posicionamento de cadeias laterais.



Figura 16 – Ensaio de Interação (co-precipitação) DraT-PII. 5µg de DraT-His e 10µg de cada uma das proteínas PII foram adicionadas em tampão contendo ADP 1mM. Depois de diversas lavagens, a eluição foi realizada com tampão de amostra (contendo SDS e β-mercaptoetanol) e as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com Coomassie Blue.

Estudos *in vitro* sugerem que a estequiometria do complexo DraT-GlnB de *A. brasilense* é de 1 monômero de DraT para 1 trîmero de GlnB. É possível que apenas um *loop* T do trîmero de GlnB seja necessário para interação entre DraT e GlnB. Para investigar esta hipótese, as proteínas GlnB e GlnB Δ42-54 foram misturadas em diferentes proporções e aquecidas a 95°C por 2 minutos seguidos por 10 minutos no gelo. Esse procedimento permite a separação dos trîmeros pelo aquecimento e formação de heterotrîmeros ao renaturar (RODRIGUES, *et al.*, 2011). A formação de heterotrîmeros foi confirmada por gel nativo, através da visualização de bandas intermediarias a GlnB e GlnB Δ42-54 (dados não mostrados). Os heterotrîmeros nas diferentes proporções GlnB: GlnB Δ42-54 foram ensaiados com His-DraT em ensaio de co-precipitação *in vitro* (figura 17). Nas proporções de 1:3 e 1:5 (GlnB:GlnB Δ42-54) é possível a visualização de duas bandas nas proteínas co-precipitadas (essa visualização é possível no gel original, mas não na figura). A banda de maior massa corresponde a proteína GlnB e a de menor massa a GlnB Δ42-54. GlnB Δ42-54 aparece como banda de menor peso devido a ausência do segmento 42-54. A presença de duas bandas co-precipitadas suporta a hipótese de que não são necessários os 3 *loops* T do trîmero de GlnB para que a formação do complexo GlnB-DraT ocorra. A proteína GlnB Δ42-54 sozinha não é capaz de interagir com DraT (figuras 16 e 17).

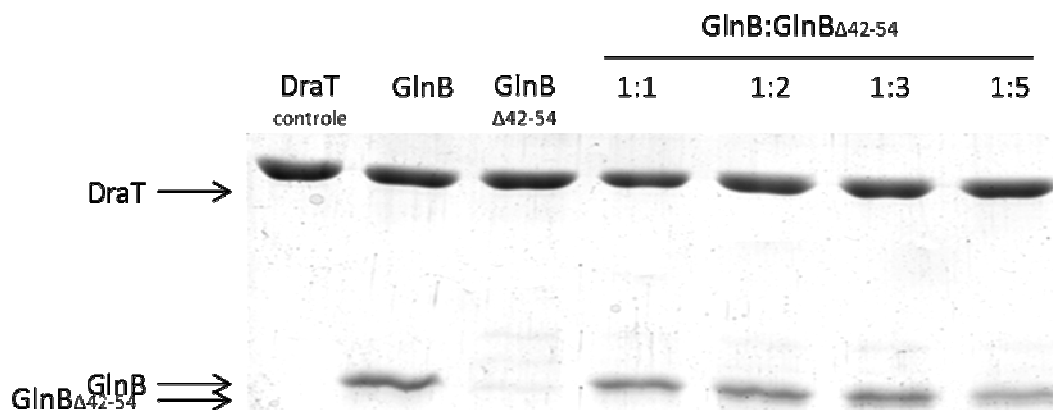


Figura 17 – Ensaio de interação da proteína DraT com GlnB, GlnB Δ 42-54 e diferentes proporções do heterotrímero GlnB:GlnB Δ 42-54. 5 μ g de DraT-His e 15 μ g de cada uma das proteínas PII foram adicionadas em tampão contendo ADP 1mM. A eluição foi realizada com tampão de amostra (contendo SDS e β -mercaptoetanol) e as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com Coomassie Blue.

5.5. Ensaio de atividade da enzima DraG *in vitro*

DraG é regulada por sua interação com GlnZ, mas apenas a formação do complexo não é suficiente para promover a inativação de DraG, a formação do complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG é necessária para inativação da DraG *in vivo* (HUERGO, 2006). A formação do complexo DraG-GlnZ não leva a alterações na estrutura de DraG (figura 6), mas parece causar impedimento estérico para acesso do substrato NifH-ADPR que é uma molécula grande. Na figura 18 é possível visualizar que a formação do complexo DraG-GlnZ provavelmente oclui o sítio ativo de DraG tornando-o inacessível para a interação com o dímero de NifH.

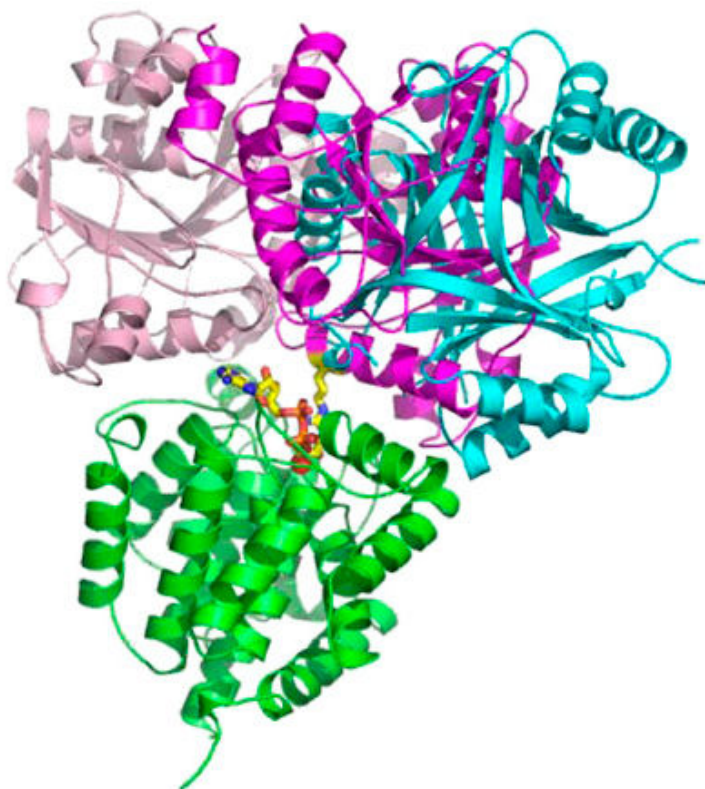


Figura 18 – Modelo da ligação de NifH ADP-ribosilada à DraG de *A. brasilense*. Sobreposição do complexo DraG(verde)-GlnZ(ciano) com um modelo do dímero de NifH mono-ADP-ribosilado (subunidades em rosa claro e escuro). Cadeia lateral de R101 ADP-ribosilada é mostrado em bastões amarelos e o íon Mg^{2+} no sítio ativo de DraG como uma esfera vermelha. Fonte: RAJENDRAN *et al.*, 2011.

A constante de dissociação (K_d) do complexo DraG-GlnZ foi determinada por Rajendran e colaboradores (2011) na presença de ADP (condição na qual ocorre formação do complexo) e foi de $1,5 \pm 0,1 \mu M$, e esta afinidade é modesta para interação proteína-proteína. No mutante *amtB*, DraG permanece ativa mesmo quando as condições para interação com GlnZ são ideais (HUERGO, 2006). Desse modo, surgiu a hipótese de que a formação do complexo ternário DraG-GlnZ-AmtB seria o principal regulador da atividade de DraG, a ligação do *loop* T de GlnZ à proteína AmtB tornaria o complexo DraG-GlnZ mais estável promovendo a inativação da enzima de forma eficiente devido a oclusão por impedimento estérico da ligação de NifH-ADPR ao sítio ativo.

5.5.1. Atividade de DraG com DAAR como substrato

A fim de se investigar se a interação DraG-GlnZ ou DraG-GlnZ-AmtB interferem na atividade de DraG, dois ensaios foram desenvolvidos.

A enzima DraG foi testada sozinha, na presença de GlnZ ou GlnZ Δ 42-54 ou GlnZ-AmtB com o substrato sintético dansil-arginina-ADPR (DAAR) (SOUZA, 2010), que é uma molécula pequena análoga ao grupo ADPR ligado ao resíduo R101 da NifH. A atividade de DraG foi quantificada através de curva padrão de dansil arginina (1 a 7 μ M). Em todos os ensaios, DraG foi primeiramente incubada com GlnZ ou GlnZ Δ 42-54 ou GlnZ-AmtB para permitir a formação dos complexos e as reações foram disparadas com DAAR. Quando ativa, DraG cliva o grupo ADPR, liberando dansil-arginina e ADPR. Dansil arginina (mas não DAAR) é capaz de se mover na placa de TLC, sendo detectado no topo da placa, enquanto DAAR (que não é móvel na TLC) permanece na origem (figura 19). A quantidade de dansil arginina é quantificada comparando o sinal em cada reação com uma curva padrão.

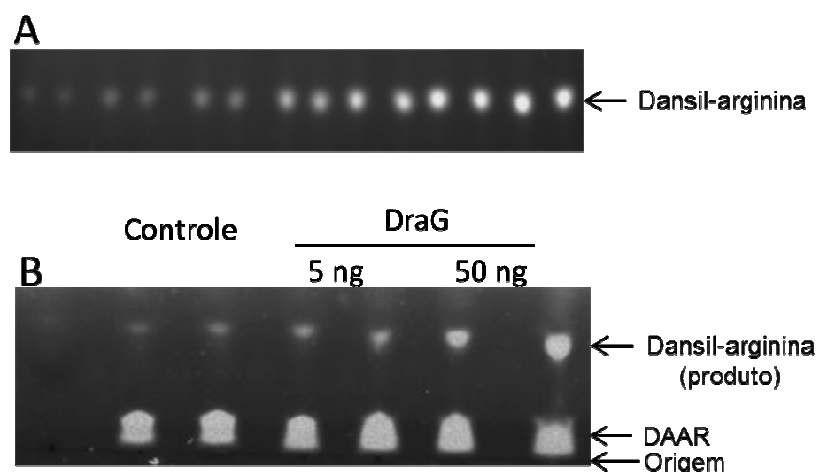


Figura 19 – Ensaio de atividade da enzima DraG utilizando DAAR como substrato. A- curva padrão de Dansil-arginina; B- atividade de DraG com DAAR como substrato. Controle: reação sem DraG. Uma fração de 1 μ L de cada reação foi aplicada na origem da placa de TLC de sílica. Após secagem da amostra aplicada, a corrida foi realizada em n-butanol:ácido acético:água (4:1:2). A revelação foi realizada após exposição da placa com luz UV 365nm e detecção através do sistema UVP. As setas indicam onde as amostras foram aplicadas (origem), o substrato não clivado dansil-arginina-ADP-ribose (DAAR) e o produto Dansil-arginina.

DraG se mostrou ativa em todas as condições testadas (figura20), e não foi observada diferença entre a atividade quando DraG sozinha ou complexada. A atividade de DraG complexada a GlnZ Δ 42-54 foi testada por essa interação parecer ser mais estável do que com a proteína GlnZ nativa, não foi observada alteração na atividade de DraG. Do mesmo modo, a formação do complexo ternário DraG-GlnZ-

AmtB não alterou a atividade de DraG. Como esse substrato é uma molécula pequena, é possível que ele consiga ter acesso ao sítio catalítico de DraG mesmo com outras proteínas associadas.

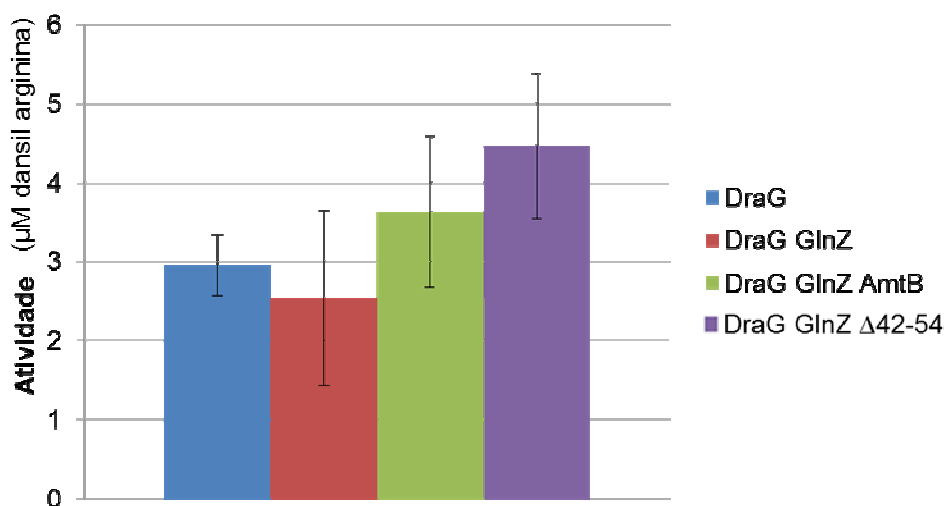


Figura 20 – Ensaio de atividade da ENZIMA DraG in vitro com substrato análogo DAAR. Os ensaios foram realizados com 5 ng de DraG, 800 ng de GlnZ ou GlnZ Δ42-54 (GlnΔ *loop*) ou 3 μg de AmtB + 800 ng de GlnZ. O tampão de reação continha ADP 1 mM para permitir a formação do complexo. A reação foi preparada sem a adição de DAAR e incubada por 5 minutos a 30°C antes da adição para permitir a interação entre as proteínas. A reação foi iniciada com DAAR e parada 5 minutos depois com a adição de EDTA. Dansil-arginina liberado foi quantificado por TLC e comparado com curva padrão. Barras de erro indicam desvio padrão das replicatas da reação.

5.5.2. Purificação parcial de NifH-ADPR

Para verificar a atividade da enzima DraG sobre seu substrato natural a proteína NifH ADP ribosilada foi parcialmente purificada. A proteína NifH de *A. brasilense* é um homodímero de aproximadamente 60 KDa que contém um cluster metálico de [4Fe-4S] entre as duas subunidades (ANGOVE *et al.*, 1998) e que é altamente sensível a O₂. Desse modo, todos os protocolos de purificação desta proteína são realizados em anaerobiose (LUDDEN e BURRIS, 1978; HALLENBECK, *et al.*, 1982; DAVIS *et al.*, 1995). Para o intuito de testar a atividade de DraG, optou-se por purificar a proteína NifH em condições aeróbicas por tornar mais fácil a manipulação durante todo o processo.

Células de *A. brasilense* estirpe UB4 mutantes na proteína DraG foram crescidas em 800 mL de meio Nfb lactato em condição de fixação de nitrogênio. Essa estirpe foi escolhida por não possuir a enzima DraG e assim não ocorre a remoção dos grupos ADP ribose adicionados por DraT após o choque de amônio dado antes das células serem coletadas. As células foram coletadas por centrifugação 10 minutos após adição de 10 mM de cloreto de amônio para promover a ADP-ribosilação da proteína NifH. O precipitado celular foi ressuspenso em 30 mL tampão de sonicação, sonificado em banho de gelo e centrifugado. O sobrenadante foi aplicado a coluna Q sepharose FF (Amersham Bioscience) de 20 mL acoplada ao sistema ÄKTA (GE Healthcare), pré equilibrada com TPA (Tris-HCL pH 8 50 mM; NaCl 0,1 M). A eluição foi realizada conforme descrito em materiais e métodos (4.17). As frações de 30% a 65% de B apresentaram coloração amarela, podendo indicar presença de componentes da nitrogenase em decorrência do ferro presente na proteína. As frações obtidas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5%. O perfil eletroforético obtido é mostrado na figura 21 A.

Para determinação de quais frações continham NifH, as bandas mais abundantes no gel de eletroforese bem como as com peso molecular próximo de 30KDa (peso molecular aproximado do monômero de NifH) foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF).

Quatorze amostras foram analisadas, algumas correspondentes a várias bandas e outras a bandas individuais. Três amostras deram positivo para NifH com massa teórica de 31,709 KDa, sendo que dessas 3, 2 eram bandas duplas extraídas correspondendo provavelmente a NifH e NifH-ADPR. As proteínas NifDK também foram identificadas (58 e 53,8KDa) e correspondem as bandas mais abundantes obtidas.

Devido a grande quantidade de diferentes proteínas co-purificadas com NifH, diferentes abordagens foram testadas com intuito de melhorar a purificação. As frações que apresentaram NifH foram reunidas e dentre as abordagens, testou-se uma segunda etapa cromatográfica com coluna de heparina. A coluna de heparina permitiu uma boa separação das proteínas NifDK mas levou a perda de grande parte de NifH (dados não mostrados). Foi ainda testada a coluna hidrofóbica phenyl Hitrap sem sucesso.

A melhor abordagem foi a filtração seguida de gel filtração. As frações contendo NifH foram reunidas e concentradas por filtração em filtro Amicom (MILLIPORE) de 10000MW. Nessa etapa, foram eliminados o sal do tampão e proteínas menores que 10KDa. A amostra foi concentrada 24 vezes. O volume final foi de 1mL e foi aplicado em coluna de gel filtração Superose 12 10/300, com eluição isocrática. A proteína NifH foi eluída em 12,1mL com massa de aproximadamente 32KDa, indicando que ela se encontrava na forma monomérica. A desnaturação do dímero em monômero pode ter sido ocasionada pela oxidação pelo oxigênio atmosférico do cluster metálico ferro-enxofre que fica na interface dos monômeros de NifH. O perfil eletroforético da fração obtida é mostrado na figura 21 B e o western blot para confirmação da presença de NifH na figura 21 C.

Mesmo após a gel filtração a fração apresentava muitos contaminantes, mas ainda assim foi possível a realização dos ensaios. Análise de western-blot indica que a preparação de NifH obtida apresenta duas bandas correspondentes a NifH-ADPR (maior peso molecular) e NifH (menor peso molecular).

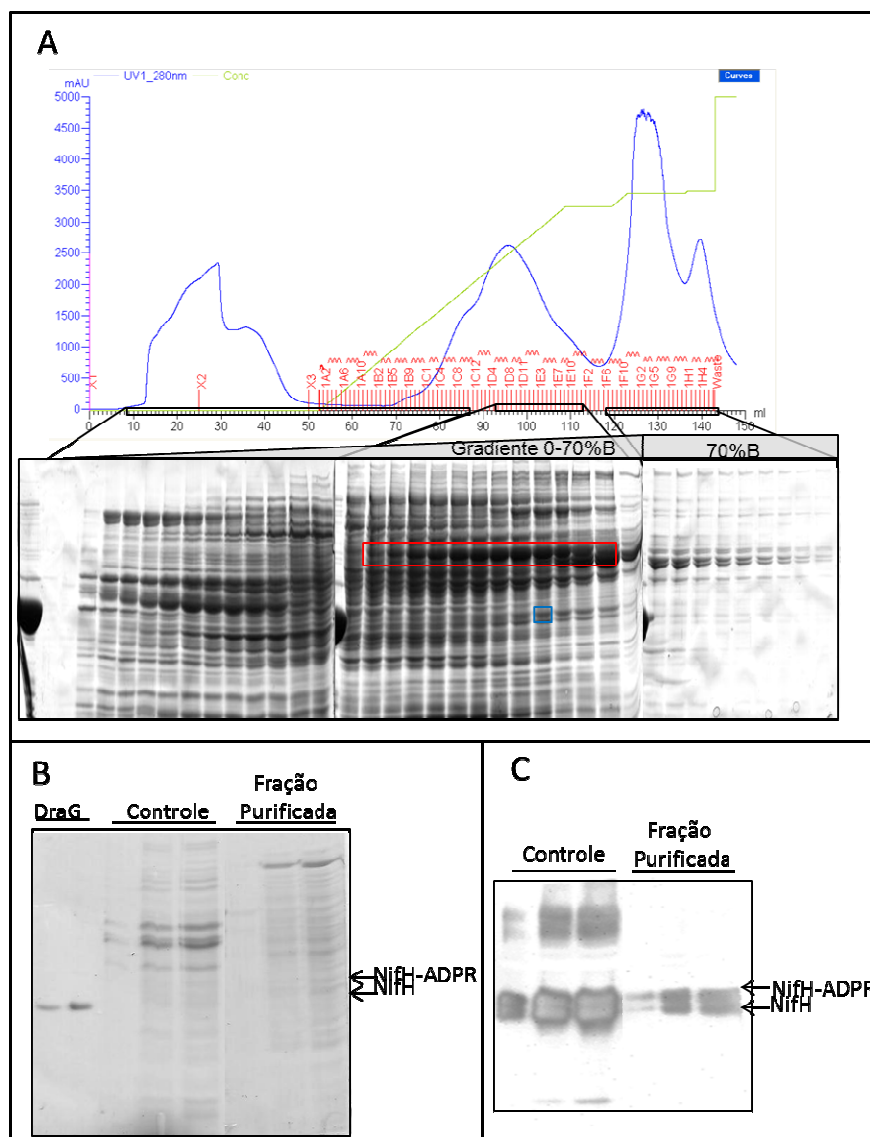


Figura 21 – Purificação parcial da proteína NifH ADP-ribosilada. A - Perfil cromatográfico UV 280 nm e eletroforético das frações obtidas durante a purificação da proteína NifH. B – Perfil eletroforético das frações submetidas a gel filtração. C – *western blot* da fração obtida após gel filtração. Células de *A. brasilense* UB4 mutante na enzima DraG foram crescidas e coletadas em condições de fixação de nitrogênio. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE (B) seguido de *western blot* usando anticorpo para NifH (C). Controle corresponde a fração previamente semi-purificada contendo NifH (confirmada por MALDI-TOF e *western blot*). As três linhas observadas para controle e fração purificada em B e C correspondem a diluições da amostra. As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada. NifH é indicada pelo quadrado azul e NifDK são indicadas pelo retângulo vermelho.

[illegible]

Uma vez determinada a melhor concentração de DraG, o ensaio foi realizado de forma semelhante ao com substrato sintético DAAR. A reação foi inicialmente montada com DraG + GlnZ, GlnZ Δ 42-54 ou GlnZ+AmtB e incubada por 5 minutos a 30° para permitir a formação dos complexos. A concentração de DraG usada foi de 20 ng/reação e diferentes concentrações das proteínas ligantes foram testadas. Foi então adicionado 1,6 μ g de NifH semi-purificada por reação. As reações foram paradas com EDTA 500 mM nos tempos 0 (controle sem DraG), 5 ou 25 minutos após o início da reação. As amostras foram analisadas por western blot conforme descrito na metodologia.

Os ensaios com GlnZ e GlnZ Δ 42-54 são mostrados na figura 23. Apesar do ensaio não ser quantitativo, aparentemente DraG apresentou atividade semelhante

ao controle quando na presença de GlnZ (figura 23), GlnZ Δ 42-54 (figura 23) ou GlnZ+AmtB (dados não mostrados). Estes ensaios foram realizados no mesmo tampão onde é detectada interação *in vitro* entre DraG e GlnZ sugerindo que a formação do complexo não é suficiente para impedir que ela remova o grupo ADP ribose de NifH.

A análise estrutural do complexo DraG-GlnZ suporta que o sítio catalítico da DraG seja ocluído da interação com o dímero de NifH ADP-ribosilada (figura 18). No ensaio utilizado NifH não se encontra na sua conformação nativa, a análise por gel filtração sugere sua massa corresponde a um monômero. Portanto, é provável que o substrato utilizado tenha uma estrutura desenovelada que permita a interação com o sítio ativo da DraG mesmo quando esta se encontra complexada a proteína GlnZ. Ensaio com a proteína NifH ativa purificada na ausência de oxigênio (dimérica com cluster metálico) serão necessários para se entender como a formação de complexos com GlnZ e AmtB controla a atividade de DraG *in vitro*.

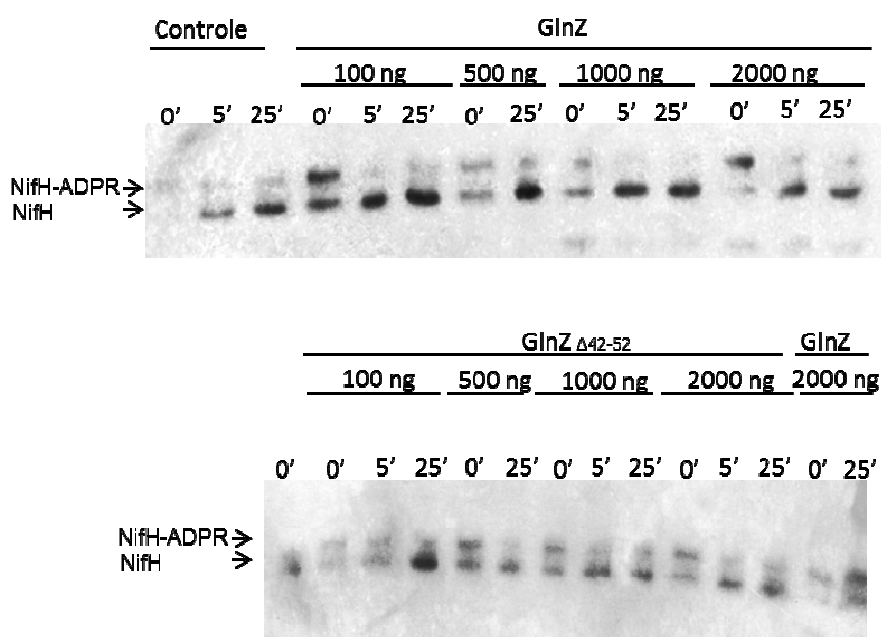


Figura 23 – Ensaio de atividade *in vitro* da proteína DraG + GlnZ ou DraG + GlnZ Δ 42-54 com NifH como substrato. Os ensaios foram realizados com 20ng de DraG e diferentes concentrações de GlnZ ou GlnZ Δ 42-54 (100, 500, 1000 ou 2000 ng). O tampão continha ADP 1mM para permitir a formação do complexo DraG-Pil. As reações contendo tampão, DraG e Pil foram incubadas por 5' a 30°C para permitir a formação do complexo e em seguida foram adicionados 1,6 μ g de proteína NifH semi purificada por reação. A reação foi incubada a 30°C e parada nos tempos indicados com tampão de amostra contendo EDTA. O tempo zero corresponde à reação antes da adição de DraG e a reação controle, à reação sem Pil. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE (cross link 12,5%) seguido de western blot, usando-se anticorpo anti-NifH. As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada.

5.6. Ensaio de Uridililação das proteínas PII por GlnD

Em Proteobacterias as proteínas PII sofrem uridililação no resíduo Tyr51. Essa reação é catalisada pela proteína GlnD (ARCONDEGUY, JACK e MERRICK, 2001). O estado de uridililação das proteínas PII pode ser visualizado em gel de acordo com a quantidade de grupos (PII livre, PII-UMP₁, PII-UMP₂ ou PII-UMP₃) (FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC, 1994). A adição do grupo UMP à PII aumenta sua taxa de migração permitindo a separação das proteínas de acordo com a quantidade de UMP.

A proteína GlnZ de *A. brasilense* ou sua ortóloga GlnK em *H. seropedice* e *E. coli* podem ser obtidas *in vivo* e *in vitro* nos diferentes estágios de uridililação (FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC, 1994; BONATTO *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008), enquanto a proteína GlnB de *A. brasilense* apresenta apenas duas bandas, correspondendo ao trímero não modificado ou completamente uridililado (ARAÚJO *et al.*, 2008; INABA, 2009). Este comportamento ainda não foi encontrado em nenhuma proteína do tipo PII (HUERGO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008). Em *A. brasilense*, ATP e 2-OG são requeridos para a uridililação de GlnZ e GlnB, sendo que nesse organismo o estado de uridililação dessas proteínas também é controlado pelos níveis de glutamina (pela resposta da enzima bifuncional GlnD) (ARAÚJO *et al.*, 2008).

As proteínas mutantes purificadas foram analisadas quanto à capacidade de serem uridililadas por GlnD o que serve com indicativo de que elas se encontram funcionais e com a conformação adequada. O ensaio foi realizado na presença de ATP e 2-OG, que são condições que favorecem a uridililação *in vitro*. De todas as proteínas mutantes analisados até aqui, esperava-se que apenas as proteínas mutantes com alteração no *loop T* apresentassem alteração na uridililação. Isso porque o aminoácido Y51, que recebe o grupo uridilil, está ausente neste mutante.

O perfil de uridililação observado (Figura 24) mostra que as proteínas mutantes GlnB Δ 42-52, GlnZ Δ 42-52 não são uridililados, enquanto as demais proteínas mutantes apresentam perfil de uridililação similar as proteínas selvagens. A migração diferencial observada entre o controle e a proteína uridililada é devida a

adição de cargas negativas provenientes dos grupos uridilil, promovendo uma migração maior que proteína controle (não uridililada) em direção ao polo positivo. A diferença de migração entre as proteínas mutantes, já discutida anteriormente, se deve a alteração dos aminoácidos, interferindo na carga global da proteína. Os perfis de uridililação obtidos indicam que as proteínas mutantes analisadas não sofreram alterações conformacionais em função da mutação, e são capazes de ligar MgATP e 2-OG como a proteína selvagem.

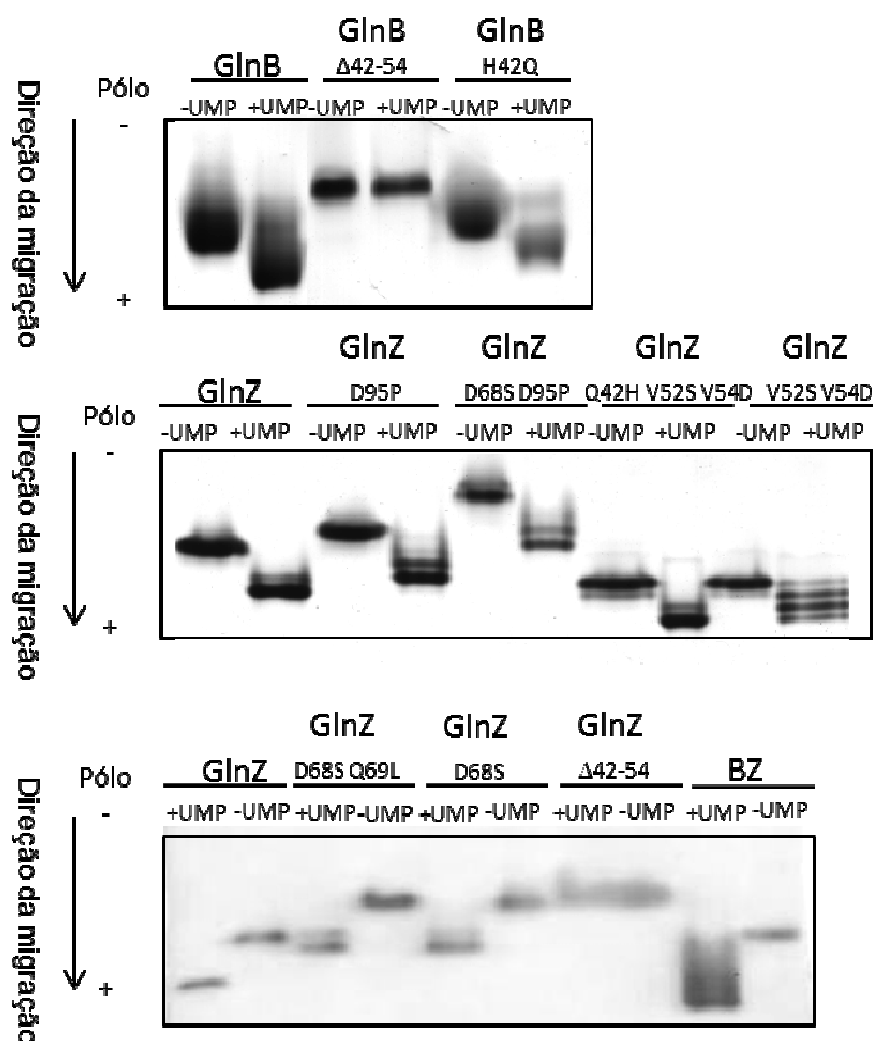


Figura 24 – Perfil de Uridililação das proteínas mutantes PII. Ensaio de uridililação, contendo ATP 1mM e 2-OG 5mM, foi realizado com proteína GlnZ, GlnB e mutantes. +UMP – amostras submetidas a uridililação; -UMP – reações controle. A reação ocorreu por 30 minutos, a 30°C, na presença de GlnD mais 3 μ g de cada proteína PII. Após 30 minutos, foi adicionado a cada tubo 5 μ L de tampão de amostra (com EDTA e sem SDS) e as amostras foram aplicadas em gel nativo 10%. Os géis foram corados com Comassie Blue.

Mutantes no resíduo Q39 já foram testados em proteínas PII de *E. coli* e *R. rubrum*. Esse resíduo parece ser importante para a uridililação. Como já discutido,

este resíduo tem um importante papel estrutural alterando a conformação do *loop* T conforme a molécula efetora ligada a PII. GlnD uridilila proteínas PII quando estas encontram-se ligadas a ATP e 2-OG (ARCONDEGUY, JACK e MERRICK, 2001; NINFA e JIANG, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2008), levando a uma conformação do *loop* T que é substrato para GlnD. Em *E. coli* o mutante GlnB Q39E perdeu a capacidade de se ligar a 2-OG e a capacidade de ser uridililado na presença de Mg^{2+} , mas pode ser uridililado na presença de Mn^{2+} (JIANG *et al.*, 1997). Já em *R. rubrum*, as proteínas mutantes GlnB e GlnK Q39E não são uridililados nem na presença de Mg^{2+} nem Mn^{2+} , enquanto o mutante GlnJ Q39E é uridililado na presença de Mn^{2+} , embora em níveis muito menores que a proteína selvagem (JONSSON e NORDLUND, 2007).

Foram testadas as proteínas mutante GlnZ Q39E (que não foi utilizada nos ensaios anteriores por interagir com os *beads* utilizados para os ensaios de interação) e Q39K. De maneira semelhante aos resultados obtidos com *R. rubrum* e *E. coli*, estas proteínas em *A. brasilense* não foram uridililadas na presença de Mg^{2+} , mas apresentaram uridililação parcial na presença de Mn^{2+} embora muito menor que a proteína nativa (figura 25), indicando que também em *A. brasilense* a alteração no resíduo 39 leva a incapacidade de ligar 2-OG impossibilitando assim que o *loop* T adquira a conformação necessária à uridililação.



Figura 25 – Papel do resíduo Q39 na uridililação de GlnZ. Ensaio de uridililação, realizado na presença de ATP 1 mM, 2-oxoglutarato 5 mM e 1 mM de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . A reação ocorreu por 30 minutos, a 30°C, na presença de GlnD mais 3 µg de proteína PII. Após 30 minutos, foi adicionado a cada tubo 5 µL de tampão de amostra com EDTA, as amostras foram aplicadas em gel nativo 10%. As reações controle não foram submetidas a uridililação. O gel foi corado com Comassie Blue.

5.7. Efeito das concentrações de ADP, ATP e 2-OG nas interações DraG-GlnZ e AmtB-Pil

As interações de proteínas Pil com seus ligantes ocorrem na célula como sinalização de respostas metabólicas. Acredita-se que proteínas Pil possam sensoriar o estado energético da célula respondendo a alterações na concentração de 2-OG e a variação da proporção ATP/ADP.

A formação dos complexos DraG-GlnZ e AmtB-Pil é afetada pela variação desses metabólitos, os complexos formam-se apenas quando as proteínas Pil estão ligadas a ADP. Desta forma, a formação destes complexos permite detectar, indiretamente, os níveis de Pil ligadas a ADP. A fim de verificar como esses efetores interferem nas interações Pil-DraG e Pil-AmtB, diferentes proporções de ATP/ADP foram testadas, assim como diferentes concentrações de 2-OG.

Como esperado, na presença de ADP foi detectada co-precipitação de GlnZ com His-DraG indicando formação do complexo (figura 26). Não houve co-precipitação quando apenas ATP foi adicionado (figura 26, linhas 1A; 1, 6 e 11B) confirmando resultados anteriores (HUERGO *et al.*, 2007). Na presença de ATP e ADP numa razão de 9:1 a interação DraG-GlnZ foi detectada numa intensidade de GlnZ co-precipitada correspondente a 48% da observada quando apenas ADP estava presente. Este resultado sugere que GlnZ é parcialmente ocupada por ADP mesmo quando ATP é nove vezes mais abundante que ADP.

A adição de 2-OG às reações contendo diferentes razões ATP/ADP alterou os resultados de maneira dependente da concentração de 2-OG. A maior concentração de 2-OG testada (2 mM) impediu a formação do complexo em quase todas as proporções ATP/ADP testadas (figura 26 B – linhas 1-4), sendo que quando ADP é o único nucleotídeo, 2 mM de 2-OG reduz apenas 23% da interação das proteínas. Nas demais concentrações de 2-OG testadas (0,1 e 0,01 mM), a formação do complexo DraG-GlnZ com ADP como único nucleotídeo foi semelhante à obtida na ausência de 2-OG (figura 26 A: linha 5; B: linhas 10 e 15).

O uso de 0,01 mM de 2-OG gerou resultados semelhantes aos observados na ausência de 2-OG, com formação do complexo mesmo quando ATP era 9 vezes mais abundante que ADP (figura 26B – linhas 11-15). Já a concentração de 0,1 mM resultou em respostas intermediárias (figura 26B - linhas 6-10), sendo observada

pouca co-precipitação nas proporções ATP/ADP de 0,9/0,1 e 0,75/0,25 e ~40% menos co-precipitação na proporção 0,5/0,5 (figura 26B linha 9) quando comparado a 0,01 mM de 2-OG (figura 26B linha 14). É provável que *in vivo*, as respostas observadas sejam semelhantes às obtidas para 0,1 e 2 mM de 2-OG, que são as concentrações mais próximas das fisiológicas encontradas em *E coli* - 0,3 a 3 mM (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK,2010; BENNETT *et al.*, 2009; YAN *et al.* 2011).

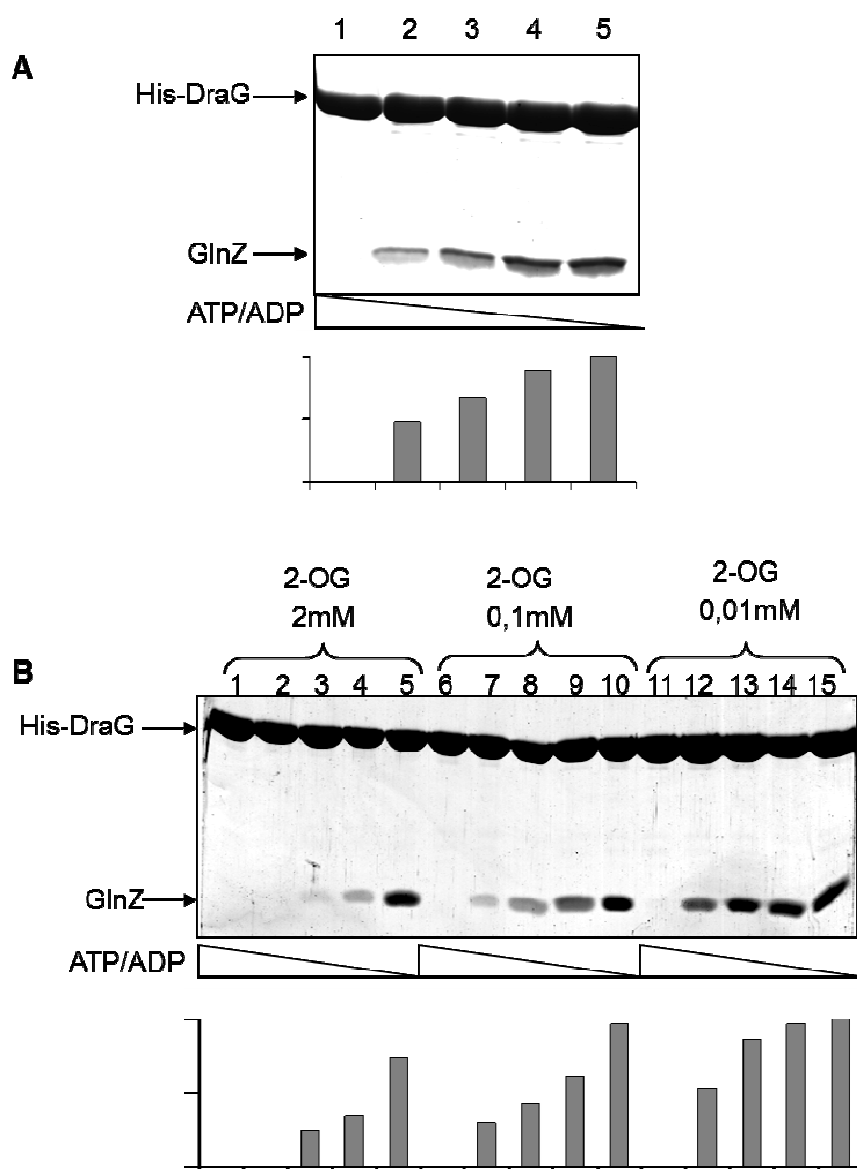


Figura 26 – Efeito de diferentes proporções ATP/ADP e diferentes concentrações de 2-OG na interação DraG/GlnZ. Dados em B – gerados por M. Scarduelli. A – ausência de 2-OG; B – linhas 1 a 5: 2-OG 2mM, linhas 6 a 10: 2-OG 0,1 mM, linhas 11 a 15: 2-OG 0,01 mM. Linhas 1, 6 e 11 ATP 1mM apenas; linhas 2, 7 e 12 ATP/ADP razão 0,9/0,1 mM; linhas 3, 8 e 13 ATP/ADP, 0,75/0,25 mM; linhas 4, 9 e 14 ATP/ADP, 0,5/0,5 mM; linhas 5, 10 e 15 ADP 1mM apenas. Amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com Coomassie Blue. O gráfico abaixo do gel indica o percentual de interação de cada linha em relação ao ensaio com ADP apenas.

Resultados semelhantes foram observados em experimentos para determinar a formação dos complexos AmtB-GlnB e AmtB-GlnZ. As respostas obtidas para GlnB e GlnZ foram semelhantes, mas diferiram ligeiramente das obtidas para GlnZ-DraG quanto à estabilidade do complexo. Para as interações com AmtB, foram testadas 6 proporções diferentes de ATP/ADP, sendo a 0,95/0,05 a única não testada pra DraG-GlnZ. Para os complexos com AmtB, a concentração 0,01mM de 2-OG (figura 27B) interferiu mais que para o complexo DraG-GlnZ, levando à diminuição na formação do complexo nas proporções ATP/ADP de 0,095/0,05 a 0,5/0,5 (figura 27 B). Para a concentração 0,1 mM de 2-OG, a formação do complexo também foi mais afetada, sendo observada co-precipitação apenas para a proporção 0,5/0,5 (figura 27C linhas 5 e 11) e para ADP sozinho (figura 27C linhas 6 e 12). Quando 2-OG estava presente na concentração 2 mM foi observada formação do complexo apenas quando ADP era o único nucleotídeo na reação (figura 27D). É notável que o complexo AmtB-Pil (figura 27) parece menos estável que o complexo DraG-GlnZ (figura 26) quando na presença de 2-OG, indicando que a interação AmtB-Pil é mais sensível à variação de 2-OG. A interação AmtB-Pil apresenta três pontos de contato que são os *loops* T. Os dados de Rodrigues e colaboradores (2011) sugerem que a perda de um ponto de contato reduz a afinidade drasticamente, ou seja, um trímero de Pil com um sítio de ligação ocupado por ATP já seria suficiente para que não fosse vista interação nesse tipo de ensaio. Já com o complexo DraG-GlnZ de acordo com a estrutura do complexo (RAJENDRAN *et al.*, 2011), em princípio, poderia ocorrer interação mesmo com 2 sítios ocupados por ATP e apenas 1 ocupado por ADP.

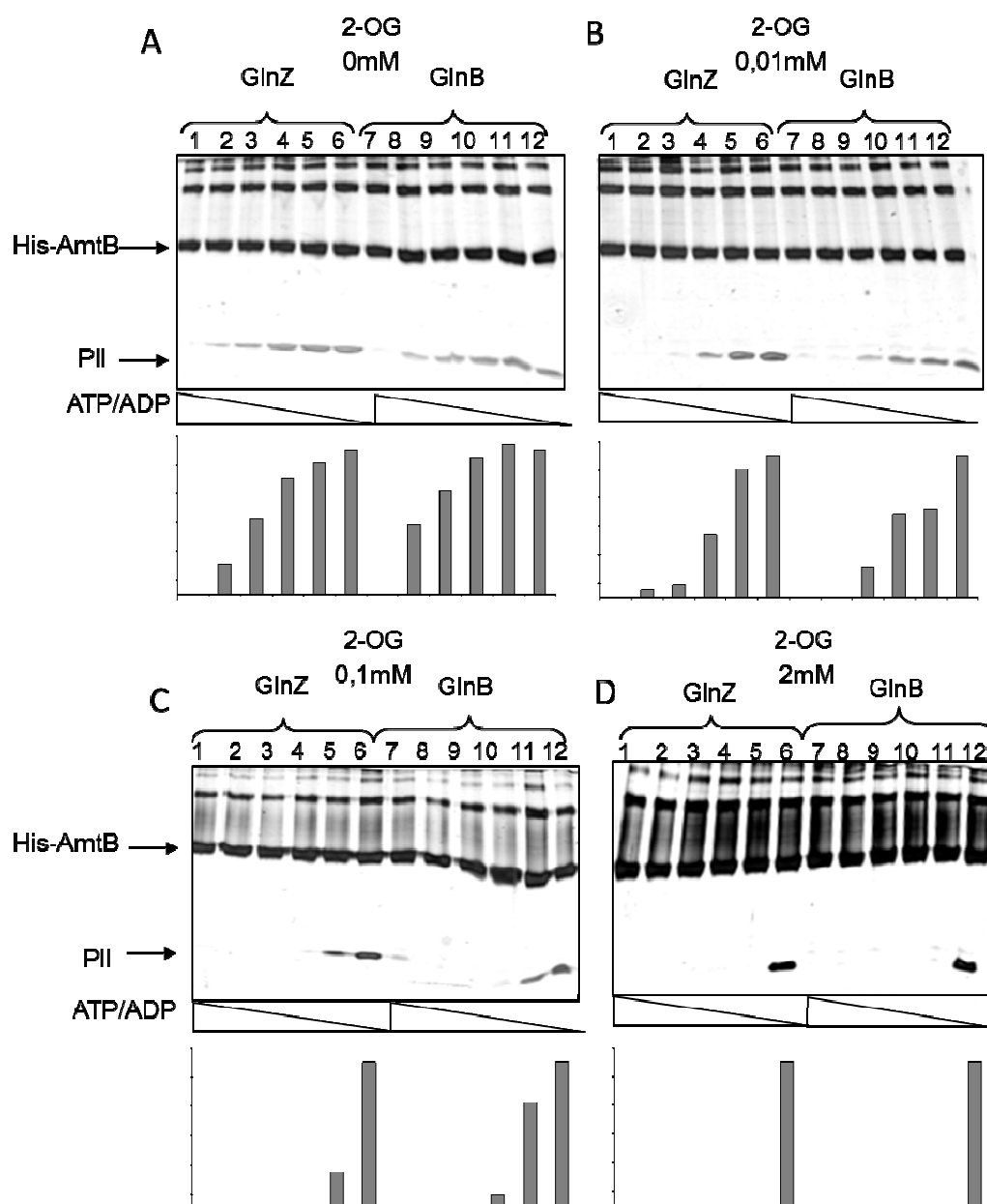


Figura 27 – Efeito de diferentes proporções ATP/ADP e diferentes concentrações de 2OG na interação AmtB/PII. Linhas 1-6 correspondem a interações AmtB-GlnZ e 7-12, interações AmtB-GlnB. Interações foram realizadas na ausência de 2-OG (A) ou com 2-OG 0,01 (B), 0,1 (C) ou 2 (D) mM em diferentes proporções de ATP/ADP. Linhas 1 e 7 ATP 1 mM apenas; linhas 2 e 8 ATP/ADP razão 0,95/0,05 mM; linhas 3 e 9 ATP/ADP razão 0,9/0,1 mM; linhas 4 e 10 ATP/ADP, 0,75/0,25 mM; linhas 5 e 11 ATP/ADP, 0,5/0,5 mM; linhas 6 e 12 ATP/ADP 0/1 mM. Amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com prata. O gráfico abaixo do gel indica o percentual de interação de cada linha em relação ao ensaio com ADP apenas.

Radchenko, Thornton e Merrick (2010) examinaram combinações de efetores para o complexo AmtB-GlnK de *E. coli* e obtiveram resultados semelhantes quanto ao efeito dos efetores, e determinaram ainda a constante de dissociação de ADP e ATP à GlnK quando na presença de 2-OG 0,1 ou 2 mM. A alta concentração de 2-OG leva à diminuição do K_d para ATP (K_{D1} 0,1 mM 2-OG 81,2 μ M; K_{D1} 2 mM 2-OG 7,2 μ M) e

aumento para ADP (K_{D1} 0,1 mM 2-OG 14,92 μ M; K_{D1} 2 mM 2-OG 56,9 μ M) indicando sinergismo positivo com ATP e efeito antagônico com ADP. Além disso, quando 2-OG está presente existe um efeito de cooperatividade negativa entre as subunidades para a ligação de ATP (1mM 2-OG: K_{D1} 7,2 μ M; K_{D2} 28,9 μ M; K_{D3} 141,3) ou ADP (1mM 2-OG: K_{D1} 56,9 μ M; K_{D2} 135,9 μ M; K_{D3} 347,1 μ M) (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; JIANG e NINFA, 2009).

O fato do aumento da concentração de 2-OG favorecer a ligação de ATP e inibir a ligação de ADP às proteínas PII pode ser explicada pela estrutura cristalográfica de GlnZ de *A. brasilense* ligada a MgATP e 2-OG (TRUAN *et al.*, 2010). ATP, 2-OG e a cadeia lateral de Q39 participam da coordenação octaédrica do Mg^{2+} , o grupo 5-carboxil de 2-OG também está envolvido em uma interação iônica com K58 (figura 28). Quando ADP está ligado, a cadeia lateral de Q39 interage com K58, ocupando o espaço do 2-OG. Isto explica porque 2-OG facilita a ligação de ATP, mas não interfere na ligação de ADP quando ATP não está presente (figuras 26 B linha 5 e 27D linhas 6 e 12).

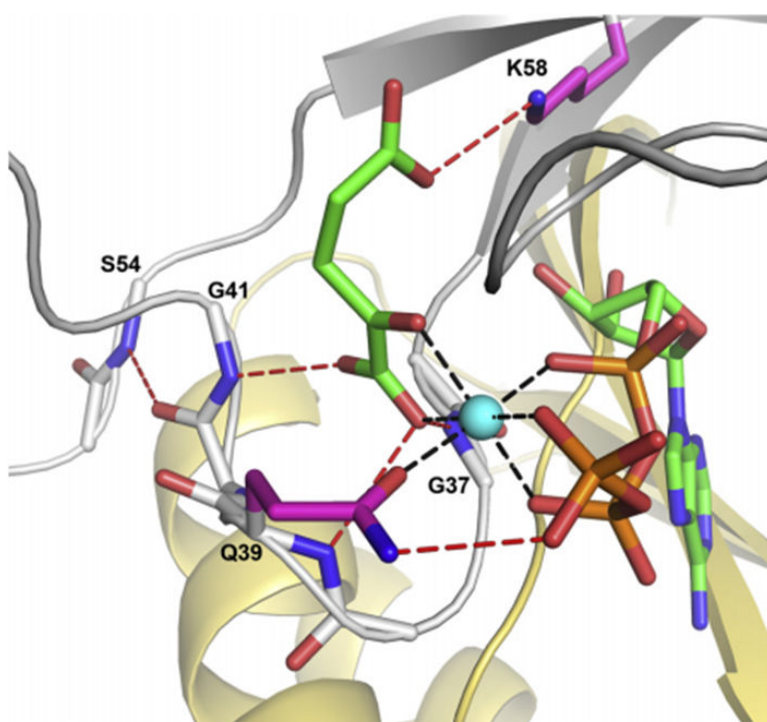


Figura 28 – Sítio de ligação a 2-OG em GlnZ de *A. brasilense*. 2-OG e ATP são mostrados em bastões verdes, Mg^{2+} é mostrado como esfera ciana e a coordenação é mostrada como linhas pontilhadas pretas. Resíduos de GlnZ são mostrados em bastões rosa e cinza. Pontes de hidrogênio são mostradas em linhas pontilhadas vermelhas. Fonte: Truan *et al.*, 2010.

Os dados obtidos indicam que a concentração de 2-OG é o fator que determina a ocupação dos sítios de ligação de nucleotídeos de GlnZ e GlnB por ADP ou ATP, sendo que a presença de 2-OG favorece a ligação de ATP e diminui a de ADP. Além disso, GlnZ e GlnB aparentemente podem sensoriar a variação na proporção ATP/ADP em baixas concentrações de 2-OG, como 0,1 mM (figuras 26B, linhas 6 a 10; 27C) onde variações na relação ATP/ADP afetaram a formação do complexo DraG-GlnZ de maneira significativa.

5.8. Efeito de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} no complexo GlnZ-DraG

De acordo com dados estruturais e bioquímicos, a presença de 2-OG facilita a ligação de ATP, entretanto, isto ocorre apenas na presença de Mg^{2+} (JIANG e NINFA, 2009; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; TRUAN *et al*, 2010). A fim de confirmar isto, ensaios de formação do complexo GlnZ-DraG foram realizados na ausência ou presença de 2-OG 2 mM e na ausência ou presença de 5mM dos metais bivalentes Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} (figura 29A). A presença de 2-OG interferiu na formação do complexo DraG-GlnZ apenas quando os metais presentes eram Mg^{2+} ou Mn^{2+} , sendo que na presença de Ca^{2+} nenhuma interferência foi notada.

Apesar de Ca^{2+} poder formar complexos octaédricos com oxigênio de forma semelhante a Mg^{2+} e Mn^{2+} (PADIYAR E SESHADRI, 1998), ele foi incapaz de facilitar a ligação de 2-OG com GlnZ. Isso poderia ser explicado pelo raio e distância de coordenação maiores do cálcio (HARDING, 2000). Foi demonstrado que Ca^{2+} remove o efeito inibitório do ATP sobre a interação NAGK-P11 (MAHESWARAN, URBANKE e FORCHHAMMER, 2004), sugerindo que Ca^{2+} possa interagir com os fosfatos do ATP, podendo competir com Mg^{2+} por essa ligação, sendo que apenas MgATP seria capaz de ligar 2-OG. Desse modo, Ca^{2+} poderia atuar como modulador de P11 a respostas a 2-OG. Para verificar essa hipótese, diferentes proporções Mg^{2+}/Ca^{2+} foram testadas, na proporção de ATP/ADP 0,75/0,25 mM e na presença de 0,1 mM de 2-OG para a formação do complexo DraG-GlnZ.

Os resultados obtidos mostram que a quantidade de GlnZ co-precipitada é maior quando apenas Ca^{2+} está presente ou quando sua concentração é cinco

vezes maior que a concentração de Mg^{2+} (figura 29B, linhas 2 e 5) indicando que Ca^{2+} é capaz de inibir o efeito de 2-OG, mas apenas quando é o único metal presente na reação ou quando está em concentração superior à Mg^{2+} . Quando Ca^{2+} e Mg^{2+} estão presentes em razão 1:1, há formação do complexo, porém menos GlnZ co-precipitada é detectada, indicando que esta formação é menor do que a que ocorre quando apenas Ca^{2+} está presente (figura 29B, linha 3). Porém *in vivo*, a concentração intracelular de Ca^{2+} livre encontrada é de 0,1 a 3,1 μM em *E. coli* (NORRIS *et al.*, 1996; DOMINGUEZ, 2004) e de $\sim 0,4 \mu M$ na cianobactéria *Synechococcus elongatus* (LEGANÉ, FORCHHAMMER E FERNÁNDEZ-PINÃS, 2009), enquanto Mg^{2+} encontra-se na faixa de mM, indicando que Ca^{2+} não é capaz de competir com Mg^{2+} pela ligação a ATP *in vivo*.

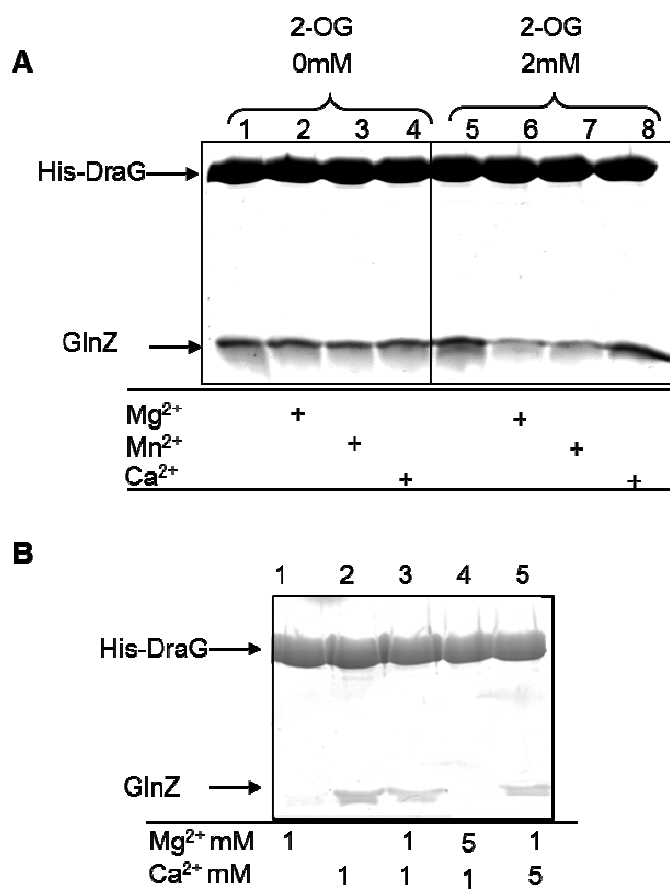


Figura 29 – Efeito de diferentes metais na interação DraG/GlnZ. A – linhas 1 e 5: sem metal; linhas 2 e 6: Mg^{2+} 1 mM; linhas 3 e 7: Mn^{2+} 1 mM; linhas 4 e 8: Ca^{2+} 1 mM. B – linha 1- Mn^{2+} 1 mM; linha 2- Ca^{2+} 1 mM; linha 3- Mg^{2+} 1 mM e Ca^{2+} 1 mM; linha 4: Mg^{2+} 5 mM e Ca^{2+} 1 mM; linha 5: Mg^{2+} 1 mM e Ca^{2+} 5 mM. As reações foram realizadas por ensaio de *pull-down* na presença de ATP 0,5 mM e ADP 0,5 mM (A) ou ATP 0,75 mM e ADP 0,25 mM (B) e ausência de 2-OG (A 1-4) ou 2-OG 2 mM (A 5-8) ou 2-OG 100 μM (B). As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com Comassie Blue.

5.9. Análise de metabólitos em *A. brasilense* (FP2)

Grande parte do controle do processo de fixação biológica de nitrogênio é realizado pelas proteínas PII e estas são reguladas pela concentração de metabólitos como ADP, ATP e 2-OG. A concentração desses metabólitos é refletida nas interações de PII com suas proteínas alvo, como DraT, DraG e AmtB. A fim de determinarmos a variação desses metabólitos em função do estado de nitrogênio da célula, células de *A. brasilense* FP2 foram crescidas e coletadas conforme descrito na metodologia e o metabólitos foram separados e analisados por LC/MS. A atividade específica da nitrogenase variou entre 6,76 e 12,6 nmol de etileno formado por minuto por mg de proteína para todas as estirpes testadas. A concentração de proteínas nas culturas durante o ensaio de atividade da nitrogenase variou de 0,23 mg/mL a 0,34 mg/mL.

Os principais metabólitos analisados foram ATP, ADP, 2-OG, glutamina e glutamato (figura 30). Para esses metabólitos, diferentes concentrações foram analisadas nas mesmas condições que as amostras, para determinação do limite de detecção e faixa de linearidade. Para ATP, o limite de detecção (inferior) foi 15µM, sendo linear na faixa de 15 a 75 µM. Para o ADP, o limite de detecção foi 5 µM, sendo linear de 5 a 50 µM. Já 2-OG, apresentou limite de detecção igual ao ADP, mas linearidade mais ampla, de 5 a 75 µM. Para Glutamato, o limite de detecção foi de 5 µM e a linearidade de 50 a 500 µM. Glutamina apresentou melhor ajuste em função quadrática, nas concentrações de 5 a 100 µM. Essas curvas foram utilizadas para determinação da concentração desses metabólitos nas amostras processadas.

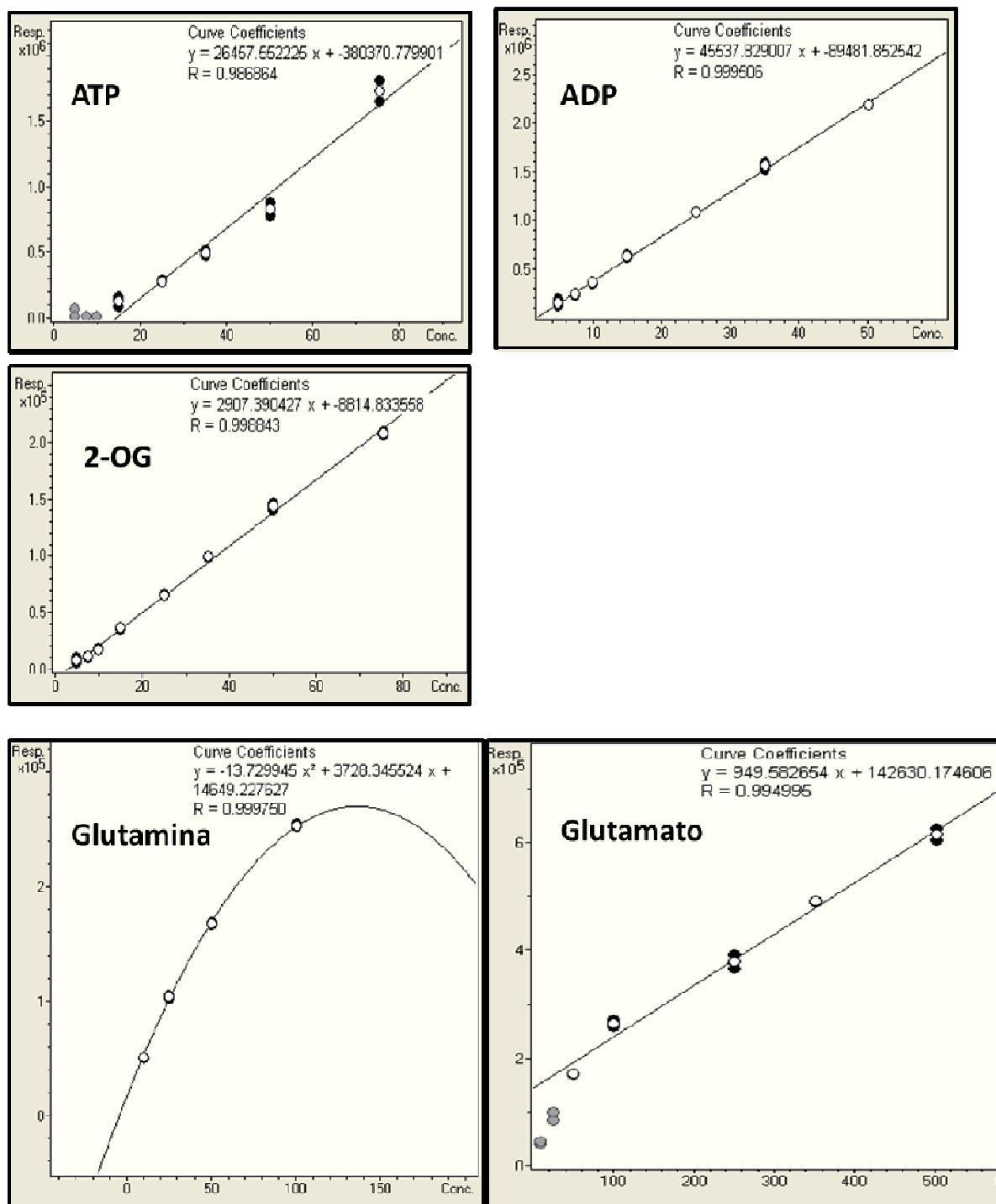


Figura 30 – Curvas padrões para ADP, ADP, 2-OG, Glutamina e Glutamato em análise LC-MS em modo negativo. Concentração em µM. Para cada metabólito, foram realizadas corridas em duplicata para cada concentração utilizada. O valor médio foi utilizado para construção de curva padrão. Curvas obtidas no programa QuantAnalysis – Bruker.

Após análise das amostras de extratos foi possível a detecção e quantificação absoluta dos metabólitos ADP, ATP, 2-OG, glutamina e glutamato e detecção dos metabólitos ADP-ribose, NADH, NAD⁺, NADPH e AMP. As massas monoisotópicas obtidas e os tempos de retenção são apresentados na tabela 6 e na figura 31.

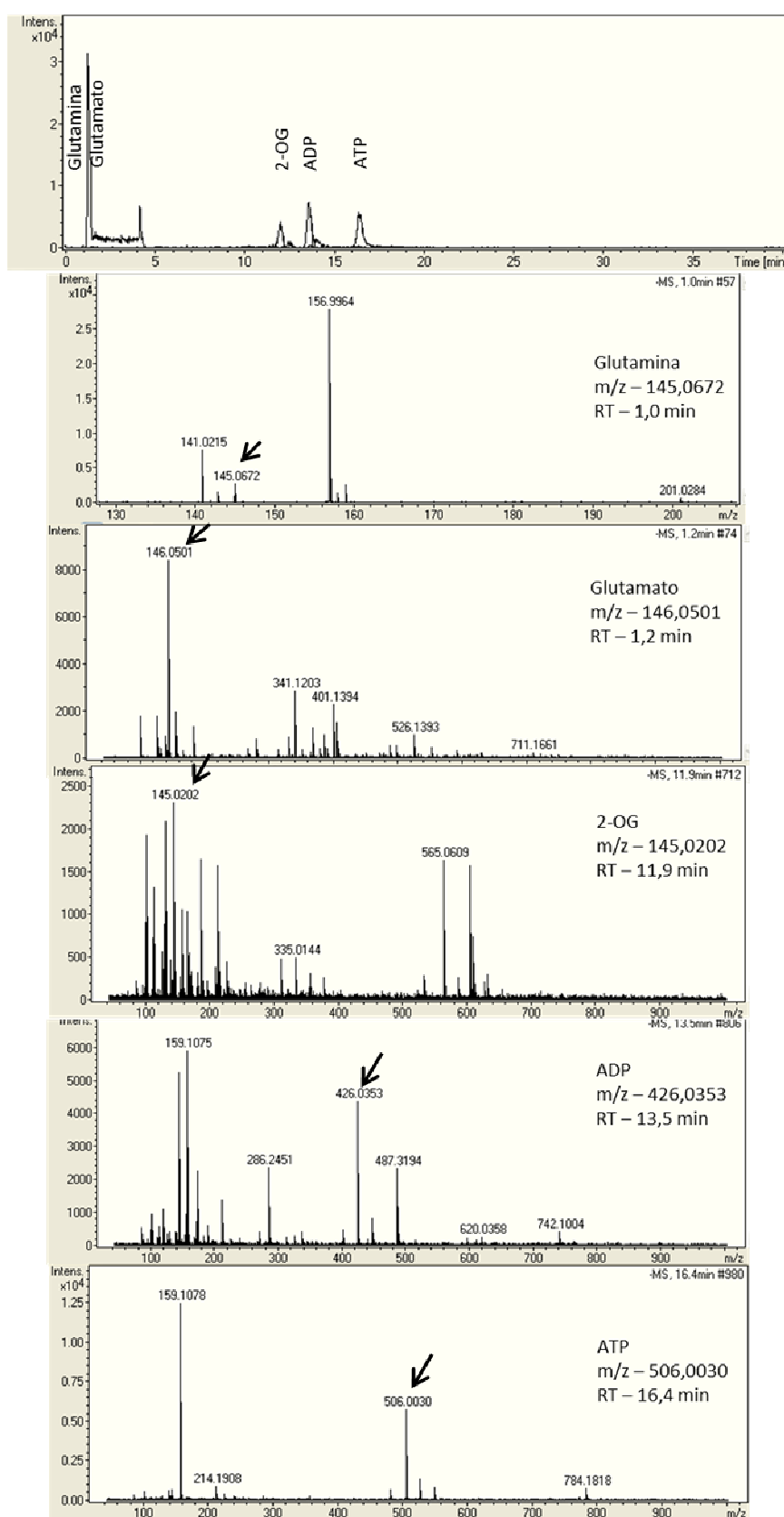


Figura 31 – Sobreposição de cromatogramas de íons de metabólitos selecionados em extratos de *A. brasilense*. Perfil do espectro obtido no pico de eluição de cada molécula. À direita são apresentados o nome da molécula, a relação massa carga m/z e o tempo de retenção. As setas indicam o pico correspondente a cada molécula.

TABELA 6 – MASSA MONOISOTÓPICA, TEMPO DE RETENÇÃO E ERRO OBSERVADOS PARA DEZ METABÓLITOS DE *A. brasilense* ANALISADOS POR LC/MS.

Metabólito	m/z observada	Massa monoisotópica teórica (MH ⁺)	Tempo de retenção (min)	Erro (ppm)
Glutamina	145,0672	145,0619	1,0	36,88
Glutamato	146,0501	146,0459	1,2	28,96
NAD ⁺	662,1105	662,1018	6,2	13,11
AMP	346,0624	346,0558	9,4	19,13
2-OG	145,0202	145,0142	11,9	41,10
ADP-ribose	558,0578	558,0644	12,9	-11,79
ADP	426,0353	426,0221	13,5	30,91
NADH	664,1256	664,1175	13,7	12,24
ATP	506,0030	504,989	16,4	27,75
NAPH	744,1198	744,0838	16,6	48,38

A concentração de 2-OG foi ainda analisada por método enzimático, para fins de comparação e validação da análise por LC/MS.

Quando analisado por LC/MS, as concentrações de 2-OG obtidas diferiram de acordo com a quantidade inicial de células coletadas para extração (figura 32A) variando de 0,75 mM quando extração ocorreu com 2 mL de células a 1,7-4,5 mM quando extração ocorreu com 15mL de célula. A análise por método enzimático apresentou resultados semelhantes às amostras analisadas por LC/MS a partir de 15 mL de células (LC/MS 15) (figura 32A, linhas roxa e azul, respectivamente). É possível que a redução do volume possa ser prejudicial para a extração de 2-OG, embora tenha sido mantida uma proporção de concentração semelhante (15 vezes para 15 mL e 16,5 vezes para 2 mL). Para os demais metabólitos, as concentrações obtidas foram semelhantes nas duas condições (figura 32).

A concentração de 2-OG nas análises enzimáticas e LC/MS 15 variou de 4,5 a 1,7 mM, sendo a concentração de 1,7 mM observada 1 minutos após o choque de amônio, subindo logo em seguida, mas voltando a baixar depois de 5 minutos (figura 32A). Entretanto, estes resultados não foram reproduzidos em diferentes experimentos. Também é possível notar que as amostras coletadas antes a perturbação metabólica com a adição de NH₄Cl (tempos -5 e 0) apresentaram grande variação. Uma análise recente de quantificação de 2-OG em *E. coli* indica que este metabólito tem um tempo de meia vida muito curto (1/2 s) e vários fatores durante a coleta de células e manipulação do extrato influenciaram significativamente na sua quantificação absoluta (YAN; LENZ; HWA, 2011).

Portanto, novos experimentos são necessários para se obter uma quantificação mais precisa dos níveis de 2-OG em *A. brasilense*.

ADP e ATP variaram pouco (figura 32B), sendo observada uma leve queda na concentração de ATP 1 minuto após a adição de NH_4Cl (3,7 para 3,4 mM) mas sem alterar a proporção ATP/ADP. A principal variação observada nos metabólitos foi à concentração de glutamina (figura 32C) que aumentou 11 vezes após a adição de amônio (de 0,07 para 0,83 mM). A concentração de glutamato seguiu um padrão semelhante ao 2-OG, com pequena queda após o choque (1,46 vezes menor em 1 minuto em relação ao tempo zero) (figura 32D). As concentrações de 2-OG obtidas foram um pouco mais altas que as obtidas por Radchenko, Thornton e Merrick, (2010) e Bennett e colaboradores (2009) para *E. coli* (0,3-1,4 e 0,44 mM respectivamente). Já a concentração de ATP ficou entre os valores obtidos por Radchenko, Thornton e Merrick (2010) que foi de 1,8 a 4,0 mM, assim como a concentração de ADP que variou de 0,59 a 0,75 mM e de glutamato (56-83 mM), estando próximas a valores relatados na literatura (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; BENNET *et al.*, 2009; OKANO *et al.*; 2010). Apenas a concentração de glutamina (0,07-0,83 mM) ficou bem abaixo de valores relatados na literatura (1,9-5,0 mM), mas estes valores correspondem à concentração de glutamina quando em suficiência de amônia (YUAN *et al.*, 2009; BENNET *et al.*, 2009; OKANO *et al.*; 2010).

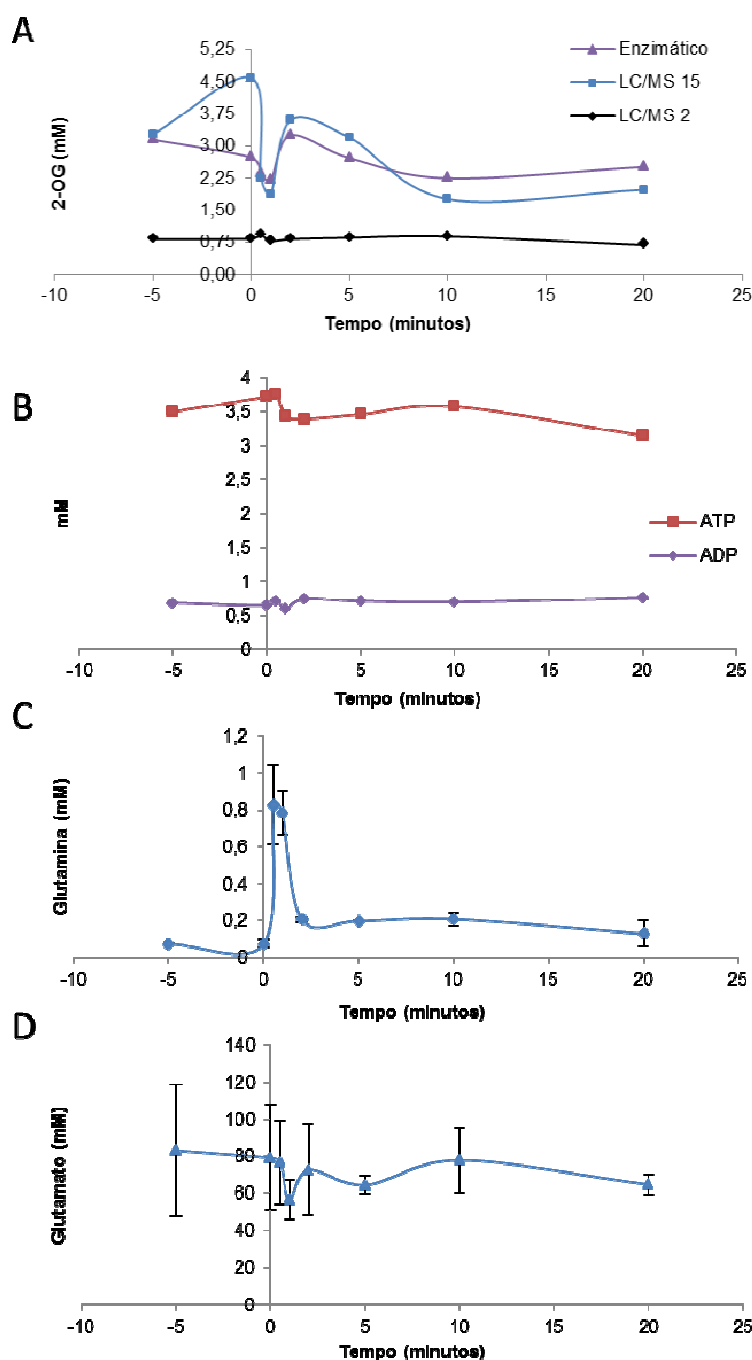


Figura 32 – Dosagem de metabólitos intracelulares em *A. brasilense* em condição de fixação de nitrogênio. A – 2-OG; B – ADP e ATP; C – glutamina; D – glutamato. Células selvagem (FP2) expressando a enzima nitrogenase foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. Aliquotas nos tempos -5, 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 minutos foram coletadas, processadas e analisadas por LC/MS. Os dados apresentados em B, C e D são médias de três replicatas biológicas. Em A, “enzimático” corresponde a média de quatro replicatas biológicas, “LC/MS 15” a uma replicata e “LC/MS 2” a média de duas replicatas biológicas. Os resultados foram calculados com base em curva padrão de cada um dos metabólitos e convertidos em mM de acordo com o número de células coletadas. Para 2-OG enzimático: as células foram coletadas nos mesmos tempos, mas a análise foi realizada em espectrofluorímetro. Enzimático: análise por método enzimático, tendo sido coletado 2mL de amostra inicial; LC/MS 2: análise por LC/MS, tendo sido coletado 2 mL de célula inicialmente; LC/MS 15: análise por LC/MS, tendo sido coletado 15 mL de célula inicialmente. O tempo zero corresponde ao momento do choque de amônio. O desvio padrão dos gráficos A e B não foram mostrados, mas foram altos.

Com exceção da glutamina, os demais metabólitos apresentaram alto desvio padrão entre os ensaios. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e o desvio entre as replicatas técnicas foi baixo. Entretanto, o desvio entre amostras biológicas diferentes foi alto (entre 3 e 36%). Os dados obtidos são provenientes de médias de três replicatas biológicas diferentes, tendo sido 2 analisados por extração de 2mL de células e um por extração de 15 mL de células. Essa variação pode ser decorrente, principalmente, de dois fatores: 1- parada de metabolismo: durante a coleta de células para a extração, os tubos foram imersos por segundos em nitrogênio líquido para parada de metabolismo, mas o metabolismo pode não ter sido parado eficientemente ou pode não ter sido parado em tempos iguais para todos os tubos; 2- diferença de volume inicial da solução de extração: a extração de metabólitos foi realizada com solução contendo metanol, que é altamente volátil, o que pode interferir no volume final e consequentemente, na concentração dos metabólitos. Ao se utilizar 15 mL de células, o volume de extração foi de 1 mL, onde a volatilização não teria grande efeito, mas a extração a partir de 2mL é realizada com 120µL de solução de extração, onde qualquer volatilização interfere na concentração final. A concentração de 2-OG, especificamente, talvez seja o metabólito mais crítico para quantificação. Segundo Yan, Lenz e Hwa (2011), os *pools* de 2-OG na célula são extremamente sensíveis a pequenas variações, tendo uma meia vida de 0,5s e podendo ser depletados ou acumulados rapidamente em resposta a pequenas variações como de temperatura durante a coleta e centrifugação e alteração no acesso a oxigênio e nutrientes após a precipitação de células por centrifugação. Isso explicaria a variação nas concentrações de 2-OG determinadas.

Quanto aos demais metabólitos detectados (tabela 6), o único que apresentou diferença no tempos analisados foi ADP-ribose, sendo observado aumento na área correspondente ao pico de ADPR detectado no cromatograma nos tempos correspondentes à inativação de NifH (dados não mostrados; figura 34A). Nos ensaios realizados com células de *A. brasilense* que não estavam fixando nitrogênio, ADPR encontra-se aumentado em todas as amostras (dados não mostrados). Esse aumento poderia estar relacionado à modificação por ADP-ribosilação de NifH, podendo servir como indicativo desta modificação. Entretanto, mais experimentos com quantificação deste metabólito serão necessários para se confirmar se de fato ele pode ser utilizado como marcador de ADP-ribosilação de NifH.

Foram ainda analisadas a concentração de 2-OG, ADP e ATP em células de *A. brasilense* que não estavam fixando nitrogênio embora estivessem sob condição de limitação de nitrogênio (glutamato 5mM) (figura 33). Foram analisadas três replicatas biológicas, e o desvio padrão obtido entre elas também foi alto mas o mesmo perfil foi observado em todas elas. É interessante destacar que a concentração de ATP aumenta de 1,2 mM para 1,8 mM depois da adição de amônio, o que pode indicar que a síntese de bases nitrogenadas para a síntese de ATP está prejudicada na ausência de nitrogênio e aumenta significativamente após a adição de NH_4^+ . Mesmo 20 minutos após a adição de NH_4Cl a concentração de ATP e ADP permanece aumentada, indicando que com a adição de amônio novas moléculas podem ter sido sintetizadas. As concentrações de ADP, ATP e 2-OG obtidas para *A. brasilense* não fixando nitrogênio estão muito próximas das concentrações obtidas por Radchenko, Thornton e Merrick, (2010) para *E. coli*, e também nesse organismo foi observado um aumento na concentração de ATP a partir de 5 minutos após o choque de amônio.

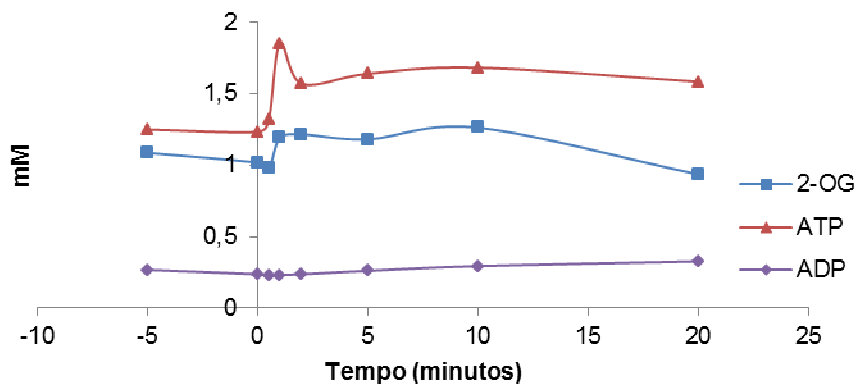


Figura 33 – Dosagem de metabólitos intracelulares em *A. brasilense* em condição de não-fixação de nitrogênio. Células selvagem (FP2) crescidas em meio NFB lactato+glutamato 5 mM, mas não fixando nitrogênio foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. Aliquotas nos tempos de 15 mL foram -5, 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 minutos foram coletadas, processadas e analisadas por espectrometria de massa. Os resultados foram calculados através da média de três experimentos, com base em curva padrão de cada um dos metabólitos e convertidos em mM de acordo com o número de células coletadas.

A concentração de glutamina reflete o amônio abundante na célula decorrente do choque de NH_4Cl , assim como a depleção de 2-OG que é convertido a glutamato. Os dados obtidos estão de acordo com o esperado para a incorporação de amônio pelo sistema GS/GOGAT. O aumento na concentração de glutamina leva à ativação da atividade removedora de uridilil (UR) de GlnD, levando à desuridililação das

proteínas PII que podem então interagir com seus alvos, como as proteínas DraG, DraT e AmtB, resultando na inativação de NifH. Uma diminuição na concentração de 2-OG pode favorecer a troca de ATP por ADP. Entretanto, as concentrações de 2-OG obtidas para *A. brasilense* são superiores às testadas nos ensaios *in vitro*, e não apresentaram uma variação significativa. Entretanto, conforme já discutido, isto pode ser em decorrência das condições experimentais utilizadas e não necessariamente reflete o que ocorre *in vivo*. A proporção ATP/ADP permaneceu próxima a 5 durante todo o ensaio, sendo que em 1 minuto após o choque, as concentrações de ATP e ADP foram 3,4 e 0,59 mM respectivamente, condição que não favorece a formação de complexos devido à alta concentração de 2-OG. Radchenko, Thornton e Merrick (2010) observaram uma diminuição de ~5 vezes na concentração de 2-OG em *E. coli* em resposta a choque de amônio, variando de 1,4 a 0,3 mM, juntamente com aumento na concentração de ADP de 0,3 para 0,6 mM e diminuição da razão ATP/ADP de 7 para 3. Nessas condições, 0,4 mM de 2-OG, a concentração de ADP é suficiente para que a formação dos complexos ocorra. Entretanto, quando a razão ATP/ADP é ~5 e a concentração de 2-OG é 1,4 mM, dificilmente ADP irá se ligar aos sítios de ligação de PII, sendo favorecida a desestabilização dos complexos DraG-GlnZ e AmtB-PII. Porém, *in vivo* a formação destes complexos ocorre, indicando que ou a dosagem de algum dos metabólitos não equivale ao seu valor fisiológico ou que algum outro sistema é responsável por regular as interações PII-proteínas alvo. Novos experimentos visando dosar variação nos metabólitos utilizando diferentes metodologias serão necessários para se obter dados de concentração intracelular mais confiáveis.

Os mesmos tempos analisados quanto aos metabólitos, foram analisados quanto a modificação de NifH e GS para verificação da resposta fisiológica de *A. brasilense* ao choque de amônio. Em *A. brasilense*, assim como em várias outras bactérias, a enzima GS é modificada em resposta a adição de amônio por adenililação de um resíduo de tirosina em cada uma das subunidades. Esta modificação leva a inativação progressiva da enzima GS quando os níveis de nitrogênio (glutamina) intracelular são elevados, servindo como um controle interno dos níveis de nitrogênio (glutamina) intracelular. Em *A. brasilense*, diferentemente de *E. coli*, as proteínas GlnB e GlnZ não influenciam significativamente a modificação da GS (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998), sugerindo que a enzima ATase deve ser

regulada apenas por efeito alostérico causado pela ligação a glutamina, como ocorre também em *E. coli* (JIANG *et al.*, 1998).

A modificação de NifH por ADP-ribosilação se iniciou 30 segundos após a adição de amônio e ainda permanece 20 minutos após o choque, embora a modificação máxima ocorra em 10 minutos (figura 34A). Já GS começa a ser modificada 1 minuto após o choque, estando totalmente desadenilada 20 minutos após o choque (figura 34B). O tempo de modificação das duas proteínas corresponde ao tempo de aumento da concentração intracelular de glutamina (figura 32C), confirmando que a modificação destas proteínas está diretamente relacionada à concentração intracelular de glutamina. O perfil observado corresponde ao esperado para resposta a choque de amônio em *A. brasilense* FP2 fixando nitrogênio descrito anteriormente (HUERGO, 2006).

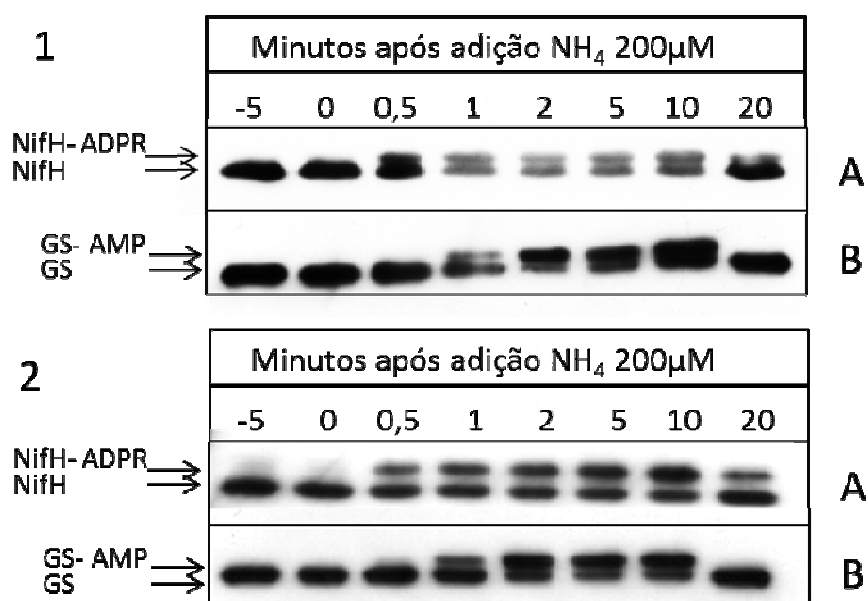


Figura 34 – Perfil de modificação das proteínas NifH e GS após choque de amônio na estirpe selvagem *A. brasilense* FP2. Células selvagem (FP2) expressando a enzima nitrogenase foram submetidas a um choque de amônio (NH₄Cl 200 μM) no tempo zero. Aliquotas foram coletadas, processadas e analisadas por *western blot* nos tempos indicados, conforme descrito em Material e Métodos. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de *western blot* usando anticorpo para NifH (A) ou GS (B). Os painéis 1 e 2 indicam duplicatas biológicas. As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada; GS-AMP indica a proteína GS adenilada.

6. CONCLUSÕES

1. Os resíduos D68 e Q69 de GlnZ são essenciais para que a interação DraG-GlnZ ocorra e a análise estrutural indica que juntamente com os resíduos 68 e 69, os resíduos Q72, T21 e L23 os responsáveis pela especificidade GlnZ-DraG. O *loop* T da proteína GlnZ é dispensável e parece interferir negativamente na interação DraG-GlnZ.
2. A interação DraT-GlnB se dá pelo *loop*T, mas também requer a participação de resíduos externos ao *loop*. O trímero de GlnB não requer os três *loops* T funcionais para que esta interação ocorra.
3. As proteínas mutantes GlnZ Q39E e Q39K aparentemente perderam a capacidade de ligar 2-OG, e consequentemente, de serem uridililados na presença de Mg^{2+} , ATP e 2-OG, não podendo assumir a conformação necessária para reconhecimento de substrato por GlnD. Isto confirma a importância desse resíduo para a ligação de efetores e alteração da conformação de proteínas PII de *A. brasilense*.
4. A enzima DraG permanece enzimaticamente ativa mesmo quando complexada a GlnZ ou GlnZ-AmtB, indicando que o complexo não é suficientemente estável para impedir a catálise (remoção ADPR de NifH) e reforçando a hipótese de que o sequestro de DraG para membrana é necessária para inativação de DraG.
5. As proteínas PII de *A. brasilense* são capazes de sensoriar a razão ATP/ADP em baixas concentrações de 2-OG, mas o controle principal da ocupação dos sítios de ligação a nucleotídeos por ADP ou ATP é exercido pela concentração de 2-OG.
6. A modificação pós-traducional de NifH e GS em *A. brasilense* ocorre em paralelo com o aumento da concentração de glutamina intracelular decorrente de choque de amônio.
7. A análise de metabólitos sugere que a síntese de ATP é altamente limitada pela disponibilidade de nitrogênio em *A. brasilense*.

7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.L.; DICKMANNS, A.; FICNER, R.; EINSLE, O. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 102(42), p.14994-14999, 2005.

ANGOVE, H.C.; YOO, S.J.; NCK, E.M.; BURGESS, B.K. An All-ferrous State of the Fe Protein of Nitrogenase - interaction with nucleotides and electron transfer to the MoFe protein. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 26330–26337, 1998.

ANTHARAVALLY, B. S.; POYNER, R. R.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Effects of specific amino acid substitutions on activities of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v.183, p.5743-5746, 2001.

ARAÚJO, L. M. Purificação e caracterização da proteína GlnB de *Azospirillum brasilense*. Curitiba, 2003. 100 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ARAÚJO, L.M.; BAURA, V.A.; SOUZA, E.M.; BENELLI, E.M.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. *In vitro* uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Protein Expr.Purif.**, v.33, p.19-24, 2004.

ARAÚJO, L.M.; HUERGO, L.F.; INVITTI, A.L.; GIMENES, C.I.; BONATTO, A.C.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v.41, p.289-294, 2008.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.65, p.80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, A; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 4830–4838, 1996.

ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v.29(2), p.431-447, 1998.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p.549-79, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can. J Microbiol.**, v.50, p.521-577, 2004.

BENNETT, B.D.; KIMBALL, E.H.; GAO, M.; OSTERHOUT, R.;VAN DIEN, S.J.; RABINOWITZ, J.D. Absolute Metabolite Concentrations and Implied Enzyme Active Site Occupancy in *Escherichia coli*. **Nat Chem Biol.** p. 593–599, 2009.

BERTHOLD, C.L.; WANG, H.; NORDLUND, S.; HÖGBOM, M. Mechanism of ADP-ribosylation removal by the structure and ligand complexes of the dimanganese mono-ADP-ribosylhydrolase DraG. **PNAS.** v.106, p.14247-14252, 2009.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A. MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.80, p.199–209, 2008.

BONATTO, A.C., COUTO,H., SOUZA, E.M., ARAÚJO, L.M., PEDROSA, F.O., NOINDORF, L., BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expr. Purif.** v.55, p.293-29, 2007.

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

BUCK, M. Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: importance of spacing between conserved sequences around positions –12 and –24 for activation by the *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. **J. Bacteriol.**, v.166, p.545-551, 1986.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v.266, p. 9339-9342, 1991.

CANFIELD, D. E., GLAZER, A.N., FALKOWSKI, P. G..The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. **Science.** v. 330. p. 192, 2010.

CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **PNAS**, v.86, p.2172-2175, 1989.

COMMICHAU, F.M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.** v.9(2), p.167-72, 2006.

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. **PNAS**. v.104, p.1213–1218, 2007.

COUTTS, C.; THOMAS, G.; BLAKEY, D. MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO. J.** v.21, p.536-545, 2002.

CRUZ L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p.2375-9, 2001.

DAVIS, R.; LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Purification and Characterization of the Alternative Nitrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v.178, p. 1445–1450, 1995.

DE ZAMAROCZY, DELORM, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol. Gen. Genet.** v. 224, p.421-430, 1990.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P_{II} and P_z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.** v. 29, p.449-463, 1998.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional Organization of the *glnB-glnA* Cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v.175, p. 2507-2515, 1993.

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

DEAN, D. R.; JACOBSEN, M. R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation.**, New York: Chapman and Hall, p.763–834, 1992.

DEKHIL, B. S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomibilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. Nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.20, p.72-77, 1997.

DETSCH, C., STULKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology.**, v.149, p.3289-3297, 2003.

DILWORTH, M. J.; Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta.** v. 127, p.285-294, 1966.

DIXON, R.; KHAN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Reviews**, v.2, p.621-631, 2004.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. (Ed.). **The Prokaryotes.** v.3., p.2236-3353, 1991.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. (Eds). Proc. of the 1st. Intl. Symp. **Nitrogen Fixation.** Pullman: Washington Univ. Press, v.2, p.518-38, 1976.

DOMINGUEZ, D.C. Calcium signalling in bacteria. **Molecular Microbiology.** v.54(2), p. 291–297, 2004.

EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J.; PÜHLER, A., (Eds). **Nitrogen fixation.** Oxford: Clarendon Press, v. 4, p. 1-49. 1986.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 1, p.17-26, 2001.

FERIA BOURRELLIER, A.B.; VALOT, B.; GUILLOT, A.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; VIDAL, J.; HODGES, M. Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v.107(1), p.502-7, 2010

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

FORCHHAMMER, K. P(II) signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends Microbiol.** v.16, p.65-72, 2008.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **Bacteriol.** v.176, p.84-91, 1994.

FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P.; BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for activity in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4679-85, 1989.

GALIMAND, M.; PERROUD, B.; DELORME, F.; PAQUELIN, A.; VIEILLE, C.; BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* *Azospirillum brasilense* Sp7. **J. Gen. Microbiol.**, v.135, p.1047-1059, 1989.

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

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL III, J.;STROUD, R.M. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **PNAS.** v. 104, p. 42–47, 2007.

GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. From a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biol. Fertil. Soils**, v. 28, p.129-136, 1999.

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W.. Regulation of biological nitrogen fixation. **J. Nutrition.**, v.130, p.1081-1084, 2000.

HALBLEIB, C.M.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Effects of Perturbations of the nitrogenase electron transfer chain on reversible ADP-ribosylation of nitrogenase Fe protein in *Klebsiella pneumoniae* strains bearing the *Rhodospirillum rubrum dra* operon. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 3681–3687, 2000.

HALLENBECK, P.C.; MEYER, C.M.; VIGNAIS, P.M. Nitrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: Purification and Molecular Properties. **J. Bacteriol.** v. 149, p. 708-717, 1982.

HARDING, M.M. The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. II. Angles at the metal atom, additional weak metal-donor interactions. **Acta Cryst.** v. D56, p.857-867, 2000.

HEINRICH, A.; WOYDA, K.; BRAUBURGER, K.; MEISS, G.; DETSCH, C.; STÜLKE, J.; FORCHHAMMER, K. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **J Biol Chem.** v. 281(46), p.34909-24917, 2006.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

HUERGO, L. F. *Regulação do metabolismo de nitrogênio em A. brasilense*. Curitiba, 2006. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS M.B.; MERRICK, M.. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters.**, v. 580, p. 5232–5236, 2006b.

HUERGO, L. F., FILIPAKI, A., CHUBATSU, L. S., YATES, M. G., PEDROSA, F. O. SOUZA, E. M. Effects of the PII and PZ proteins over-expression in the nitrogen metabolism of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p.47-54, 2005.

HUERGO, L.F.; MERRICK, M.; MONTEIRO, R.A.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. *In vitro* interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **J. Biol. Chem.** v.284, p.6674-6682, 2009.

HUERGO, L.F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; ARAUJO, L.M.; SOUZA, E.M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase

regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v.66, p.1523-1535, 2007.

HUERGO, L.F.; PEDROSA, F.O.; MULLER-SANTOS, M.; CHUBATSU, L.S.; MONTEIRO, R.A.; MERRICK, M.; SOUZA, E.M. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**. v. 158, 2012.

HUERGO, L.F., SOUZA, E.M., ARAUJO, M.S., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S., STEFFENS, M.B., MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Mol. Microbiol.**, v. 59, p.326–337, 2006a.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**., v. 331, p.413–425, 2010.

INABA, J. Caracterização funcional da proteína GlnB de *Azospirillum brasilense* Curitiba, 2009. 131 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de CiênciasBiológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

JIANG, P.; ZUCKER, P.; ATKINSON, M.R.; KAMBEROV, E.S.; TIRASOPHON, W.; CHANDRAN, P.; SCHEFKE, B.R.; NINFA, A.J. Structure/Function Analysis of the PII Signal Transduction Protein of *Escherichia coli*: Genetic Separation of Interactions with Protein Receptors. **J. Bacteriol.** v.179, p. 4342–4353, 1997.

JIANG, P.; NINFA, A.J. Sensation and Signaling of R-Ketoglutarate and Adenylylate 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, p.11522–11531, 2009.

JIANG, P.; PELISKA, J.A.; NINFA, A.J. The regulation of Escherichia coli glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation

of glutamine synthetase adenylylation state. **Biochemistry**. v.37, p. 12802-12810, 1998.

JONSSON, A.; NORDLUND, S. In Vitro Studies of the Uridylylation of the Three PII Protein Paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: the Transferase Activity of *R. rubrum* GlnD Is Regulated by α -Ketoglutarate and Divalent Cations but Not by Glutamine. **J. Bacteriol.** v.189, p. 3471–3478, 2007.

KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. The Escherichia coli PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.** v.270(30), p.17797-17807, 1995.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P. W. Effect of ammonium, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v. 158, p. 713-720, 1984.

KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, L.J.; STROUD, RM. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**. v.305 (5690), p.1587-1594, 2004.

KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, v. 140, p.45-55, 1989.

KLASSEN, G., SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal-transducing protein. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 5637–5641, 2005.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v.277, p. 680-685, 1970.

LAVRINENKO K, CHERNOUSOVA E, GRIDNEVA E, DUBININA G, AKIMOV V, KUEVER J, LYSENKO A, GRABOVICH M.. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.60, p.2832-7, 2010.

LEIGH; J.A.; DODSWORTH J.A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 61, p.349-377, 2007.

LEGANÉS, F.; FORCHHAMMER, K.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F. Role of calcium in accumulation of cyanobacterium *Synechococcus elongates* PCC 7942 to nitrogen starvation. **Microbiology.** v.155, p. 25-34, 2009.

LI, X. D.; HUERGO, L. F.; GASPERINA, A.; PEDROSA, F. O.; MERRICK, M.; WINKLER, F. K.. Crystal Structure of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DRAG) reveals conservation in the ADP-ribosylhydrolase fold and specific features in the ADP-ribose-binding pocket. **J. Mol. Biol.**, v.390, p. 737-746, 2009.

LIN S. Y., YOUNG C. C., HUPFER H., SIERING C., ARUN A. B., CHEN W. M., LAI W. A., SHEN F. T., REKHA P. D., YASSIN A. F.. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.59, p. 761-5, 2009.

LJUNSGSTRÖM , E., YATES, M. G., Norduland, S.. Purification of the activating enzyme for the Fe-protein of nitrogenase from *Azospirillum brasilense*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.994, p.210-214, 1989.

LOWERY, R. G.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p.16714-16719, 1988.

LUDDEN, P.W.; BURRIS, R.H. Purification and Properties of Nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*, and Evidence for Phosphate, Ribose and an Adenine-Like Unit Covalently Bound to the Iron Protein. **J. Biochem.** v. 175, p.251-259, 1975.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Ann. Acad. Bras. Cienc.**, v.55, p.417-430, 1983.

MAHESWARAN, M.; URBANKE, C.; FORCHHAMMER, K. Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. **J. Biol. Chem.** v.279(53), p.55202-10, 2004.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v.57, p.620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v.57, p.2805-2809, 2007b.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. **EMBO J.**, v.2, p.39-44, 1983.

MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p.293-302, 1988.

MERRICK, M. J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIO, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (Eds.). **New horizon in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p.1-12, 1993.

MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. p.835-876, 1992.

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

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol.Gen.Genet.**, v.185, p.75-81, 1982.

MOURE, V.R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO L.M.; OLIVEIRA, M.A.S.; GERHARDT, E.C.M.; MÜLLER-SANTOS, M.; ALMEIDA, F.; PEDROSA, F.O.; VALENTE, A.P.; SOUZA, E.M.; HUERGO, L.F. Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression and Purification** . v.81, p.83–88, 2012.

NINFA, A.J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 8, p. 168-173, 2005.

NINFA, A.J.; JIANG, P.; ATKINSON, M.R; PELISKA, J.A. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Curr. Top. Cell Regul.** v.36, p.31-75,2000.

NORDLUND, S.; Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for a analysis of a biological process**. Horizon Scientific Press, 2000.

NORRIS, V.; GRANT, S.; FREESTONE, P.; CANVIN, J.; SHEIKH, F.N.; TOTH, I.; TRINEI, M.; MODHA, K.; NORMAN, R.I. Calcium Signalling in Bacteria. **J. Bacteriol.** v.179, p. 3677–3682, 1996.

OKANO, H.; HWA, T.; LENZ, P.; YAN, D. Reversible adenylylation of glutamine synthetase is dynamically counterbalanced during steady-state growth of *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** v.404, p.522–536, 2010.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v.63, p.366-370, 1997.

PADIYAR, G.S.; SESHADRI, T.P. Metal-nucleotide interactions: crystal structures of alkali (Li⁺, Na⁺, K⁺) and alkaline earth (Ca²⁺, Mg²⁺) metal complexes of adenosine 2'-monophosphate. **J. Biomol. Struct. Dyn.** v.15(4), p.803-21, 1998.

PASSAGLIA, L. M.; NUNES, C. P.; ZAHA, A.; SCHRANK, I. S. The nifHDK operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes H, D, K, an 353 bp orf and gene Y. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.24, n.7, p.649-75, 1991.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.900-915, 1983.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROSS, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J Bacteriol.** v.185(17), p.5240-5247, 2003.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência hoje**, v.6, p.12-13, 1987.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v.56, p.1263-1271, 2006.

PLAZINSKI, J.; DART, P. J.; ROLFE, B. G. Plasmid visualization and nif gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. **J. Bacteriol.**, v.155, p.1429-33, 1983.

POPE, M.R.; MURREL, S.A.; LUDDEN, P.W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphorylation of a residue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 82, p. 3173-3177, 1985.

POSTGATE, J. R. The fundamenals of nitrogen fixation. **Cambridge: Cambridge University Press**, p.375-85, 1982.

RADCHENKO, M. V., THORNTON, L., MERRICK, M.. Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarato. **J Biol Chem.**, v. 285, p.31037-45, 2010.

RAJENDRAN, C.; GERHARDT, E.C.M.; BJELICC, S.; GASPERINAC, A.; SCARDUELLI, M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; MERRICK, M.; SOUZA, E.M.; WINKLER, F.K.; HUERGO, L.F.; LI, X.D. Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.108(47), p.18972-18976, 2011.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; de LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.37, p.43-51, 1987.

RODRIGUES, T.E.; SOUZA, V.E.P.; MONTEIRO, R.A.; GERHARDT, E.C.M.; ARAÚJO, L.M.; CHUBATSU, L.S. SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; HUERGO, L.F. In vitro interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the PII protein GlnZ. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1814, p. 1203–1209, 2011.

SAARI, L.L.; TRIPLETT, E. W.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, v.259, p.15502-15508, 1984.

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

SARKAR, A.; KÖLER, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. A novel regulatory role of the Rnf complex of *Azoarcus* sp. strain BH72. **Mol. Microbiol.** v. 83, p.408-422, 2012.

SCARDUELLI, M. Interações *in vitro* entre as proteínas P_{II} e as enzimas regulatórias da nitrogenase em *Azospirillum brasilense*, Relatório Iniciação Científica - CNPq Iniciação Científica e Integração Acadêmica da Universidade Federal do Paraná, 2010.

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

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

SINGH, M.; TRIPATHI, A. K.; ROBERTS, G. P. Identification of a regulatory nifA type gene and physical mapping cloned new nif regions of *A. brasilense*. *Mol. Gen. Genet.*, v.219, p. 235-240, 1989.

SON, R. S; RHEE, S. G. Cascade Control of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p.8690-8695, 1987.

SOUZA, B.E.P. Análise Funcional da Enzima DraG de *Azospirillum brasilense*. Relatório Iniciação Científica – Fundação Araucária. Coordenadoria de Iniciação Científica e Integração Acadêmica da Universidade Federal do Paraná, 2010.

STEENHOUDT, O. VANDERLEYDEN, J.. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology**. Reviews 24, p.487-506, 2000.

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*. **Mol Microbiol.** v. 54, p.132-147, 2004.

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

TEIXEIRA, P.F.; JONSSON, A.; FRANK, M.; WANG, H.; NORDLUND, S. Interaction of the signal transduction protein GlnJ with the cellular targets AmtB1, GlnE and GlnD in *Rhodospirillum rubrum*: dependence on manganese, 2-oxoglutarate and the ADP/ATP ratio. *Microbiology*, v.154, p.2336–2347, 2008.

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

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology an introduction.** Nova York: Benjamin/Cummings Publishing Company, inc., p.664-673. 1995.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; LI, X.D .; WINKLER, F. K. A new PII protei structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **J. Mol. Biol.** v. 400, p. 531-539, 2010.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterization of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutante. **Mol. Gent. Genomics.** v. 5, p. 813-820, 2002.

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

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 21, p. 133-146, 1996.

WESTBY, C.A.; ENDERLIN, C.S.; STEINBERG, N.A.; JOSEPH, C.M.; ZEEKS, J.C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J. Bacteriol.** v. 169, p. 4211-4214, 1987.

WINKLER, F.K. Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. **Pflugers Arch.** v.451, p.701-7, 2006.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; ALEXANDRE, G.; SUKHARNIKOV, L.O.; WUICHET, K.; HURST, G.B.; MCDONALD, W. H.; ROBERTSON, J.S.; BARBE, V.; CALTEAU, A.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; NORMAND, F.; BOYER, M.; SIGUIER, P.; DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; CONDEMINÉ, G.; KRISHNEN, G.S.; KENNEDY, I.; PATERSON,

A.H.; GONZÁLEZ, V.; MAVINGUI, P.; ZHULIN, I.B. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **PLoS Genet.** v. 7, 2011.

WOLFE, D.M.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G.P. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v.189(19), p.6861-6869, 2007.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v.55, p.1435-1438, 2005.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J Mol. Biol.** v.282, 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*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.77, p. 6763–6771, 2011.

YILDIZ, O.; KALTHOFF, C.; RAUNSER, S.; KÜHLBRANDT, W. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. **EMBO J.** v.26(2), p.589-599, 2007.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W.A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v. 58, p.959-963, 2008.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). **Biological Nitrogen Fixation.** London: Chapman ; Hall, New York, p.43-86, 1992.

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

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G.P.. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 152, p.195-204, 1997.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* from *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 3364-3369, 1992.

ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X.; XU, L.; LAI, R.. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.55, p.1-7, 2009.

ZHU, Y.; CONRAD, M. C., ZHANG, Y., ROBERT, G. P..Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signal. **J. Bacteriol.**, v.188, p.1866-1874, 2006.

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

8. ANEXO

Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of P_{II}-target interaction

Chitra Rajendran^{a,1}, Edileusa C. M. Gerhardt^{b,1}, Sasa Bjelic^c, Antonietta Gasperina^c, Marcelo Scarduell^d, Fábio O. Pedrosa^b, Leda S. Chubatsu^b, Mike Merrick^d, Emanuel M. Souza^b, Fritz K. Winkler^e, Ludano F. Huergo^{b,2}, and Xiao-Dan Li^{a,2}

^aMacromolecular Crystallography, Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, 5232 Villigen PSI, Switzerland; ^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Science and Technology for Biological Nitrogen Fixation, Universidade Federal do Paraná Curitiba, CEP 81531-990 CP 19046, Brazil; ^cDepartment of Molecular Microbiology, John Innes Center, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, United Kingdom; and ^dBiomolecular Research Laboratory, Paul Scherrer Institut, 5232 Villigen PSI, Switzerland

Edited by* Johann Deisenhofer, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and approved September 16, 2011 (received for review May 19, 2011)

Nitrogen metabolism in bacteria and archaea is regulated by a ubiquitous class of proteins belonging to the P_{II} family. P_{II} proteins act as sensors of cellular nitrogen, carbon, and energy levels, and they control the activities of a wide range of target proteins by protein-protein interaction. The sensing mechanism relies on conformational changes induced by the binding of small molecules to P_I and also by P_{II} posttranslational modifications. In the diazotrophic bacterium *Azospirillum brasilense*, high levels of extracellular ammonium inactivate the nitrogenase regulatory enzyme DraG by relocating it from the cytoplasm to the cell membrane. Membrane localization of DraG occurs through the formation of a ternary complex in which the P_I protein GlnZ interacts simultaneously with DraG and the ammonia channel AmtB. Here we describe the crystal structure of the GlnZ-DraG complex at 2.1 Å resolution, and confirm the physiological relevance of the structural data by site-directed mutagenesis. In contrast to other known P_{II} complexes, the majority of contacts with the target protein do not involve the T-loop region of P_I. Hence this structure identifies a different mode of P_I interaction with a target protein and demonstrates the potential for P_{II} proteins to interact simultaneously with two different targets. A structural model of the AmtB-GlnZ-DraG ternary complex is presented. The results explain how the intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate regulate the interaction between these three proteins and how DraG discriminates GlnZ from its close paralogue GlnB.

membrane sequestration | nitrogenase regulation | P_{II} protein | ammonium transport | ADP ribosylation

Nitrogen is an indispensable element for life. In bacteria and plants, many aspects of the regulation of nitrogen metabolism are controlled by a class of ubiquitous proteins called P_{II} signal transduction proteins (1–4). P_{II} proteins are present in all domains of life and are one of the most widely distributed signal transduction proteins in nature: some prokaryotes encode multiple P_{II} homologues (2, 3). P_{II} proteins act as a central processing unit receiving signals of carbon, energy, and nitrogen levels, integrating and transforming them into different P_{II} conformational states. The multitude of P_{II} conformations control their ability to interact with, and thus regulate the activity of, a variety of target proteins including transporters, enzymes, and transcriptional regulators (4).

P_{II} proteins form compact barrel-shaped homotrimeric structures, in which each monomer is 12–14 kDa containing three functionally important loops: the T-, B-, and C-loops (4). The 20-residue long T-loop is structurally very flexible and participates in protein interactions in all the structures of P_{II}-target complexes solved to date. The T-loop also contains the site of posttranslational modification if it is needed. In Proteobacteria, Y51 in the T-loop is subjected to reversible uridylation in response to the cellular glutamine levels (5). The effector molecules

ATP, ADP, and 2-oxoglutarate (2-OG) influence the conformational states of P_{II} proteins by specifically binding in the three lateral intersubunit clefts of the trimer. The nucleotide binding sites are mainly formed by the B- and C-loops from opposing subunits; ADP and ATP can occupy these sites competitively (4, 6). The recent structures of *Azospirillum brasilense* GlnZ (7) and of *Synechococcus elongatus* P_{II} (8) revealed that the P_{II} 2-OG binding site is also located in the intersubunit cleft adjacent to the nucleotide binding pocket.

Structures of P_{II} proteins complexed to three different targets have been solved. The *Escherichia coli* GlnK-AmtB complex shows a trimer: trimer stoichiometry (9) and has been well characterized genetically and biochemically. In this complex, ADP occupies the three nucleotide binding sites of GlnK; the T-loop adopts an extended structure in which the conserved GlnK residue R47 at the apex of the T-loop inserts deeply into the cytoplasmic pore exit of the AmtB channel, thereby blocking ammonia conduction.

The P_{II}-NAGK (N-acetylglutamate kinase) complexes formed both in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* and the plant *Arabidopsis thaliana* (10, 11) have a 1:2, NAGK hexamer: P_{II} trimer, stoichiometry. This interaction relieves the feedback inhibition exerted by arginine over NAGK. Two surfaces of P_{II} are important for NAGK contacts, one in the P_{II} trimer body and the other in the T-loop. The interaction between these proteins is favored by the presence of Mg-ATP and disrupted by the addition of 2-OG.

The third P_{II} complex structure is that of *S. elongatus* P_{II} with another of its targets, the PipX protein (12, 13). PipX is a coactivator of the cyanobacterial transcription factor NtcA (14), and P_{II} interaction with PipX prevents activating NtcA. One P_{II} trimer binds to three monomers of PipX through the extended P_{II} T-loops. ADP is bound to P_{II} in one structure (12) and its presence is known to enhance binding affinity (14).

A. brasilense is a Gram-negative bacterium that can fix nitrogen under microaerobic conditions through the action of the enzyme nitrogenase. In *A. brasilense*, and in some other diazotrophs including *Rhodospirillum rubrum*, nitrogenase activity is regulated

Author contributions: E.C.M.G., M.S., E.O.P., L.S.C., M.M., E.M.S., E.K.W., L.F.H., and X.D.L. designed research; C.R., S.B., A.G., L.F.H., and X.D.L. performed research; C.R., S.B., M.M., E.K.W., L.F.H., and X.D.L. analyzed data; and M.M., E.K.W., L.F.H., and X.D.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

Data deposition: The atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 3OST).

C.R. and E.C.M.G. contributed equally to this work.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: xiao.li@psi.ch or huergo@ufpr.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1108038108/-DCSupplemental.

at the posttranslational level by reversible ADP-ribosylation of the dinitrogenase reductase component of nitrogenase, encoded by *NifH* (2, 15). ADP-ribosylation of R101 in one subunit of the dimeric *NifH* is catalyzed by dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) resulting in *NifH* inactivation (16). The reverse reaction is catalyzed by the dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) restoring nitrogenase activity (17, 18). The signal for nitrogenase inactivation is either the presence of ammonium in the environment or the energy depletion that occurs by shifting the organism from microaerobic to anaerobic conditions (15). The prevailing environmental conditions determine the activity status of both the DraT and DraG enzymes, and although very little is known regarding the anaerobic response, a model for the ammonium signalling pathway has emerged recently (6).

Several lines of evidences showed that both the DraT and DraG activities are regulated by interaction with P_{II} proteins (6, 19, 20) of which *A. brasilense* encodes two paralogues, namely GlnB and GlnZ (21). DraT interacts with GlnB while DraG interacts with GlnZ, in vitro these two protein complexes are stabilized by ADP and disrupted in the presence of MgATP and 2-OG (6). Upon an ammonium upshift, GlnB interacts with and presumably activates DraT, promoting *NifH* inactivation through ADP-ribosylation. In the meantime, the membrane ammonium transport protein AmtB interacts with GlnZ (presumably with ADP bound), which recruits DraG to form a ternary complex. DraG membrane sequestration by the AmtB-GlnZ pair is presumed to result in DraG inactivation, either by conformational change, by *NifH* inaccessibility or by physical separation from its substrate *NifH* (6, 19, 20, 22, 23).

Here we describe the crystal structure of the GlnZ-DraG complex at 2.1 Å, we propose a model of the AmtB-GlnZ-DraG ternary complex, and we examine whether *NifH* could still productively bind to DraG complexed with GlnZ. The GlnZ-DraG complex is the first P_{II} complex structure where most of the T-loop does not participate in protein-protein contacts, thus expanding the structural diversity of P_{II} interactions with protein targets. The structure of the complex, together with site-directed mutagenesis studies, explains the sensitivity of the GlnZ-DraG complex to ATP and 2-OG and why DraG interacts with GlnZ but not with its closely related paralogue GlnB.

Results and Discussion

Crystal Structure and GlnZ-DraG Interface. The GlnZ-DraG complex reconstituted in vitro was purified by gel filtration chromatography and crystallized in the presence of ADP. Crystals diffract to 2.1 Å and the structure solution was performed by molecular replacement using MOLREP within the ccp4i suite (24) using as search models GlnZ - PDB ID 3MHY (7) and DraG - PDB ID 3G9D (25).

The structure of the trimeric GlnZ-DraG complex is shown in Fig. 1A: three DraG monomers interact with one GlnZ trimer, the three nucleotide binding sites of GlnZ are occupied by ADP. The T-loop of GlnZ (residues 37–55) is only ordered at its base (up to K40 and again from V53). The metal binding sites at the active site of DraG are occupied by two Mg^{2+} ions as observed in the previous structure of DraG [PDB ID 3G9D, (25)].

Each DraG molecule is bound to the lateral face of the barrel-shaped GlnZ trimer, at the interface region between two GlnZ chains (Fig. 1). The total buried surface area in one such interface amounts to 2,091 Å² to which the two GlnZ chains (B and B') contribute 1,367 and 724 Å² respectively. The interatomic contacts are predominantly polar or mixed (polar-nonpolar) and only 31% are nonpolar. A major part of the interface involves residues from the exposed face of DraG α -helix 5 (D100, R103, R104, R107, I110, M111, and H112) which form numerous polar and nonpolar contacts with one GlnZ chain (GlnZ-B). The respective GlnZ residues are located in segments S1 (T21–I25) and S2 (D68–

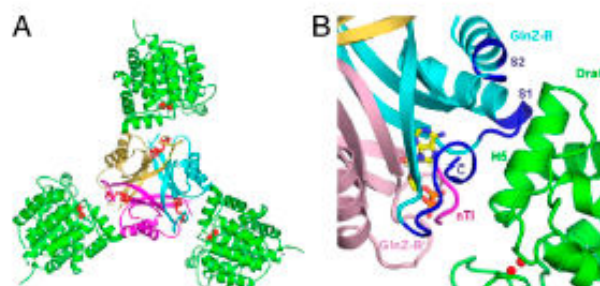


Fig. 1. Structure of the trimeric *A. brasilense* GlnZ-DraG complex. (A) Cartoon representation of three DraG monomers (green) bound to the central GlnZ trimer (cyan, light pink, and orange). The ADP molecules bound in the lateral clefts between GlnZ chains are shown as red sticks, the two Mg^{2+} ions present in the active site of each DraG monomer as red spheres. (B) Close-up of the DraG-GlnZ interface involving the two GlnZ monomers B and B' (cyan and magenta respectively). The DraG-interacting chain segments S1, S2, and C of monomer GlnZ-B are emphasized in dark blue; the N-terminal part of the interacting T-loop of chain GlnZ-B' in magenta, and ADP is shown in yellow sticks.

V73) and at the C terminus (R101–L112) (Fig. 1B, Fig. S1, S2, and Table S1). The C-terminal carboxylate of GlnZ is prominently involved in salt bridge interactions with three arginine guanidinium groups, two from DraG (R104 and R107) and one from its own chain (R101). The side chain of M111 is buried in a hydrophobic pocket formed by GlnZ residues L23, I25, Q69, Q72, and V73. Moreover, residues R38, K40, R85, and I86 from the adjacent GlnZ chain (GlnZ-B') interact with DraG via residues W50, L51, V96, and D97 (Fig. S1 and Table S1). Unlike in all other known structures of complexes of P_{II} proteins with target proteins (AmtB, NAGK, PipX) the T-loop remains largely disordered after complex formation with DraG. This disorder is not unexpected considering that formation of the ternary complex DraG-GlnZ-AmtB is predicted to involve mainly interactions between AmtB and the T-loop as will be discussed later.

The Role of P_{II} Protein Effectors in GlnZ-DraG Complex Formation. Previous in vitro studies have shown that the GlnZ-DraG interaction is stabilized by ADP and is prevented in the presence of ATP and 2-OG (6, 23). To further investigate the thermodynamics of the GlnZ-DraG interaction, ITC experiments were carried out by titrating DraG into a solution containing GlnZ saturated with ADP. The isothermograph was fitted to a one-set-of-sites model yielding a K_d 1.5 ± 0.1 μ M with a stoichiometry of 1.03 ± 0.01 (monomer:monomer) (Fig. 2) in agreement with the stoichiometry observed for the crystallized complex. The modest strength of this protein-protein interaction is in line with the relatively low percentage of nonpolar contacts. No interaction between DraG and GlnZ was detected by ITC in the absence of ADP (Fig. 2).

The stabilization of the GlnZ-DraG complex by ADP appears sensible as this complex binds to AmtB and ADP is known to favor formation of the GlnZ-AmtB complex (23). In this way ADP-GlnZ/DraG is predisposed for efficient interaction with AmtB. Superposition of ADP-GlnK from the *E. coli* AmtB-GlnK complex [2NUU, (9)], or ADP- P_{II} from the *S. elongatus* PipX- P_{II} complex [3N5B, (13)], on the ADP-GlnZ structure in the *A. brasilense* GlnZ-DraG complex confirms that the ADP binding mode is essentially the same in all three complexes. In particular, the ADP bound state is characterized by interactions of the main chain N-H groups of T-loop residues R38 and Q39 with the α -phosphate of ADP and also by the side chain interaction between residues Q39 and K58 (13). To determine the role of GlnZ Q39 in interaction with DraG and AmtB a GlnZ Q39K mutant was obtained, purified, and assayed for in vitro interaction with a His-tagged version of DraG or AmtB by pull-down (Fig. S3). In contrast to the wild-type protein, the Q39K mutant did not inter-

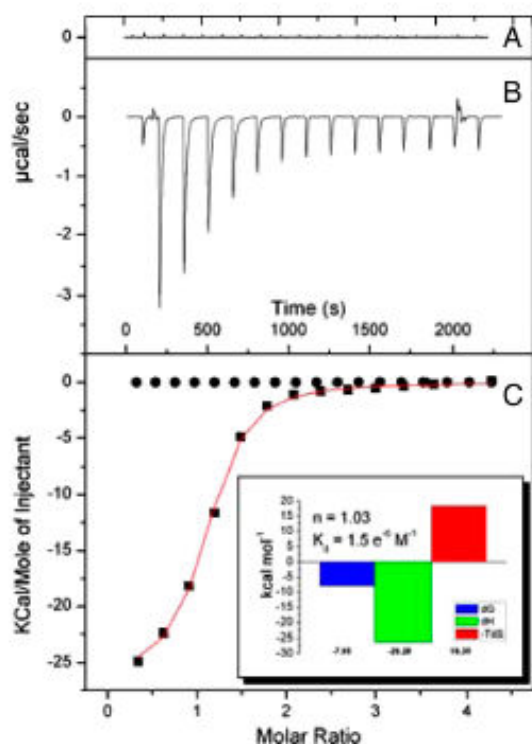


Fig. 2. Binding of DraG to GlnZ. Raw calorimetric output from binding experiments of DraG to GlnZ [(A): without ADP; (B): with ADP]. (C): symbols (circles: without ADP; squares: with ADP) represent the integrated heats after normalization for the molar concentration. Continuous lines are nonlinear fits for a one-set-of-sites binding model. Thermodynamic properties of the DraG-GlnZ interaction in the presence of ADP are described in the insert of (C).

act with His-DraG or His-AmtB in the presence of ADP (Fig. S3), indicating that the Q39-K58 interaction is indeed critical to position the GlnZ T-loop in a conformation compatible with DraG and AmtB interaction.

As previously discussed (7) the local N-terminal T-loop structure (residues 37–40) is quite different in P_{II} proteins complexed with MgATP, with MgATP/2-OG, or with ADP. In these comparisons, the K58 ammonium group interacts with E44, the 5-carboxy moiety of 2-OG and the carboxamide group of Q39 respectively. Inspection of the GlnZ-DraG complex structure shows that for the MgATP and MgATP/2-OG binding modes the respective local T-loop structures are incompatible with DraG binding. The conformation of the GlnZ C terminus is very similar in the complexes with MgATP/2-OG and ADP/DraG and a role of this structural element in the regulation of DraG binding is not indicated.

DraG Specificity for GlnZ vs. GlnB. *A. brasilense* encodes two P_{II} proteins, GlnB and GlnZ. Even though these two proteins are 67% identical in amino acid sequence they have specific functions. In vitro, GlnZ only interacts with DraG and GlnB only interacts with DraT at detectable levels (6, 20). Similarly, GlnB, but not GlnZ, activates the *nif* gene transcriptional regulator NifA (21, 26) and GlnB is more efficient than GlnZ in the regulation of the NtrB/NtrC two component system (19, 21). The only known common protein target for these paralogues is the ammonium transport protein AmtB (23).

Sequence alignment of *A. brasilense* GlnB and GlnZ reveals that of the 11 GlnZ residues that participate in side chain contacts with DraG, six differ between the two P_{II} proteins (Fig. S4).

These six residues are all located in the structurally adjacent chain segments S1 and S2, suggesting that the corresponding surface is the main determinant of GlnZ specificity for interaction with DraG. To test this hypothesis we constructed two GlnZ mutants (D68S and D68S,Q69L) and two chimeric proteins: one with the N terminus of GlnB (up to I91) and the C terminus of GlnZ, named GlnBZ1, and the other with the N terminus of GlnZ (up to A48) and C-terminal of GlnB, named GlnZB1. All these proteins were purified and assessed for in vitro interaction with a His-tagged version of DraG using pull-down assays (Fig. 3A and Fig. S3).

In the presence of ADP, GlnZ but not GlnB coeluted with His-DraG confirming previous results (Fig. 3A). GlnZ D68S coeluted with His-DraG (Fig. 3A) though the amount of the coeluted protein was lower than with wild-type GlnZ, suggesting a less stable interaction. GlnZ D68S Q69L and the GlnBZ1 and GlnZB1 chimeras did not coelute with His-DraG at detectable levels which is consistent with an important role of residues of segment S2 in GlnZ vs. GlnB discrimination. We suggest that GlnZ residues T21 and L23, located in segment S1, also contribute to specificity as their substitutions in GlnB (H21 and V23) are predicted to perturb the local van der Waals packing significantly.

The GlnZ T-loop deletion (Δ Q42-S54) coeluted with His-DraG in greater amounts than the wild-type protein suggesting a more stable interaction (Fig. 3A). Possibly, this additional stabilization may have an entropic origin, as the long wild-type T-loop may pay a larger entropic penalty than the truncated variant upon binding (more T-loop conformations will become forbidden by DraG-caused steric exclusion).

In the presence of ATP, none of the P_{II} proteins coeluted with His-DraG at detectable levels in Coomassie stained gels (Fig. 3A). All the P_{II} mutants responded as expected regarding motility in native gels (Fig. S5), interaction with His-AmtB and in vitro uridylation assays (Figs. S6 and S7), supporting the proposition that the nucleotide and 2-OG binding sites, as well as the quaternary structures were not significantly affected by the various mutations.

Comparison of GlnZ-DraG Complex with the Putative GlnZ-DraG Complex in *R. rubrum*. Nitrogenase regulation by the DraT and DraG enzymes has been most fully described in *A. brasilense* and *R. rubrum* (21, 27). *R. rubrum* encodes three P_{II} paralogues,

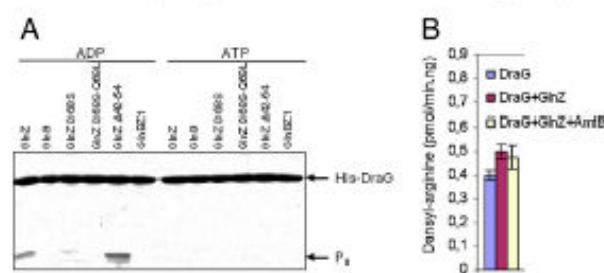


Fig. 3. In vitro interaction between His-DraG and various P_{II} mutant proteins and influence of GlnZ on the activity of DraG. (A) Complex formation was assessed by coelution using Ni^{2+} beads. Reactions were performed in the presence of 1 mM ADP or ATP as indicated. Binding reactions were conducted in 500 μ l of buffer, adding 10 μ g His-DraG and 10 μ g of the indicated purified P_{II} . The eluted fractions were subjected to SDS-PAGE and the gel was Coomassie blue stained. Arrows indicate the identified proteins. (B) In vitro DraG activity using DAAR as substrate in the presence of GlnZ and GlnZ + AmtB. 10 ng of DraG was mixed with 80 ng of GlnZ plus 600 ng of His-AmtB as indicated. The reaction buffer contained 1 mM ADP to allow protein complex formation. Reaction was initiated by adding the substrate (DAAR), after 5 min at 30 $^{\circ}$ C the reactions were quenched with EDTA. The dansyl-arginine released was quantified by TLC and compared with a standard solution. Error bars indicate the standard deviation in replicate reactions.

namely GlnK, GlnB, and GlnJ (28). Despite their marked similarity (Fig. 1C), GlnJ seems to be more important than the other paralogues for inactivation of DraG via AmtB-mediated membrane sequestration (29). Alignment of the DraG and P_{II} amino acid sequences (Fig. S4) and comparison of the *A. brasilense* (25) and *R. rubrum* DraG crystal structures (30) revealed that many contacts mapped in the *A. brasilense* GlnZ-DraG complex, are predicted to be conserved in the *R. rubrum* GlnJ-DraG complex (Table S1). In only a few cases there are changes in one or both proteins that could enable modified contacts. Moreover, based on these comparisons, discrimination of *R. rubrum* GlnK and GlnB appears likewise to reside in chain segments S1 and S2.

One example of a modified interaction is that of *A. brasilense* GlnZ R103 with DraG D100 which is N100 in *R. rubrum*. In vivo studies showed that a *R. rubrum* DraG N100K variant lost regulation by ammonium, and this is predicted from our structure because the DraG K100 interaction with GlnJ R103 and the nearby R38 residues would be repulsive, thereby disfavoring complex formation (29, 31). A case of two complementary changes is the interaction of *A. brasilense* DraG H112 with GlnZ D68 which become substituted by E112 and N68 respectively in *R. rubrum* permitting a similar side chain interaction. In *R. rubrum* GlnB and GlnK N68 is substituted by Alanine and Glycine respectively which both would unfavorably affect this contact.

In Vitro DraG Activity. As the natural substrate for DraG, namely ADP-ribosylated NifH, is highly oxygen sensitive, a low molecular weight alternative substrate, dansyl-arginine-ADP-ribose (DAAR), was used to assess in vitro DraG activity. The results indicate that DraG has the same activity whether alone, in the presence of GlnZ, or in the presence of both GlnZ plus AmtB (Fig. 3B). Pull-down experiments indicated that the AmtB-GlnZ-DraG ternary complex was formed under similar conditions used to measure DraG activity (Fig. S2). These results suggest that DraG activity on this small substrate is not affected by binding to GlnZ and AmtB.

Superposition of the free and GlnZ-bound DraG structures reveals that they are very similar including the DraG active site consistent with the maintenance of intrinsic enzymatic activity. Furthermore, inspection of the surface of the GlnZ-DraG complex shows that the DraG active site would be accessible to a low molecular weight substrate like DAAR despite the fact that the GlnZ binding site is relatively close to the DraG active site cavity (Fig. 1). This accessibility of the DraG active site is also apparent in a putative structural model of the AmtB-GlnZ-DraG ternary complex. This model was generated by superposition of the P_{II} trimers of the *E. coli* AmtB-GlnK and the *A. brasilense* GlnZ-DraG complex structures (Fig. 4A). The two P_{II} trimers superpose with a low rmsd of 0.67 Å (Cα positions of residues 1–39 and 56–112). The model illustrates that simultaneous binding of GlnZ to both AmtB and DraG is structurally feasible. Ordering the disordered T-loops of DraG-bound GlnZ in the extended conformation observed in AmtB-bound GlnK is sufficient to enable the expected conserved interaction with AmtB. That interaction requires small shifts of residues 40 and 53–55, in between which the T-loop is disordered in the DraG-GlnZ complex. These shifts can occur without affecting any protein-protein interactions of the two binary complexes, in particular the interactions of the charged GlnZ side chains R38 and K40 with DraG can be perfectly maintained. *A. brasilense* AmtB shares 50% sequence identity with *E. coli* AmtB and a very similar structure can be safely predicted. The model shown is thus likely to be close to the unknown structure of the *A. brasilense* AmtB-GlnZ-DraG ternary complex (9).

The *A. brasilense* AmtB-GlnZ-DraG Ternary Complex and Regulation of DraG Activity. The current model for the regulation of DraG activity in *A. brasilense* suggests that in response to an ammonium

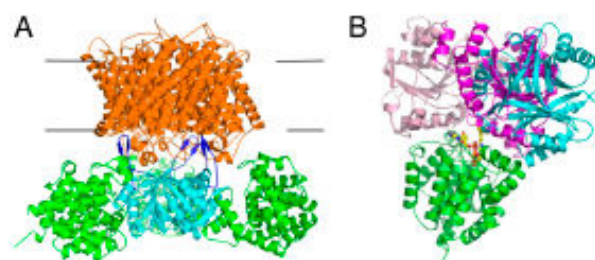


Fig. 4. Cartoon representation of a putative *A. brasilense* AmtB-DraG-GlnZ ternary complex and a modeled DraG-NifH complex. (A) The *E. coli* AmtB (orange)-GlnK (cyan) complex (2NUU) was superimposed on the *A. brasilense* complex of DraG (green) with GlnZ (not shown for clarity) using their structurally very similar P_{II} trimers. The (ordered) GlnK T-loops are emphasized in dark blue. (B) Illustration of the steric overlap between the DraG (green)-GlnZ (cyan) complex and a modeled complex of DraG with a mono-ADP-ribosylated NifH dimer (lightpink and magenta subunits). The ADP-ribosylated R101 side chain is shown in yellow stick representation, the Mg²⁺ ion at the DraG active site as a red sphere.

upshift, DraG interacts with the AmtB-GlnZ complex on the cell membrane, and that this process inactivates DraG by a yet unidentified mechanism (9). Disruption of the *A. brasilense* glnZ gene does not dramatically affect DraG regulation in vivo (32). It was therefore postulated that in the absence of GlnZ, GlnB could bind DraG (albeit more weakly than GlnZ, explaining why no GlnB-DraG interaction is detected in pull-down assays) and regulate its activity (32). Conversely, disruption of the *A. brasilense* amtB gene prevents both the ammonium-induced membrane sequestration and the inactivation of DraG in vivo suggesting that DraG is only inactivated when bound to the membrane in the AmtB-GlnZ-DraG complex (9). Consequently either the binary GlnZ(ADP)-DraG complex is active on the 66 kDa ADP-ribosylated NifH dimer or the binary complex is not stable enough in vivo.

The large size of the natural substrate NifH and the fact that the ADP-ribosylated R101 is located on a rigid structural element of NifH and not on a flexible peptide segment makes it attractive to consider steric hindrance as the mechanism of DraG inactivation upon complex formation with GlnZ or GlnZ-AmtB. Using the NifH structure of *Azotobacter vinelandii* as a model (PDB code 1G21) we have evaluated possibilities how ADP-ribosylated NifH could be docked into the DraG active site in a stereochemically satisfactory fashion without causing severe main chain clashes between the two proteins (see *SI Materials and Methods*). Although our docking attempts are based on avoiding steric clashes and do not consider detailed protein-protein interactions the results strongly indicate that simultaneous binding of GlnZ and NifH is impossible because of massive interpenetration of the two proteins for all considered NifH docking modes (illustrated for the best solution in Fig. 4B). Thus, from structural considerations it appears very unlikely that the binary complex would allow the active site of DraG to contact NifH R101. If this proposition is correct, one would have to postulate that the binary complex is not stable enough for efficient DraG inactivation in vivo and that ternary complex formation with AmtB is required. Experiments using ADP-ribosylated NifH as substrate will be necessary to clarify whether the proposed mode of DraG inactivation is correct.

Final Remarks. The structure of the *A. brasilense* GlnZ-DraG complex reveals a different form of P_{II} protein target interaction and provides the structural basis of how P_{II} proteins can engage simultaneous interaction with two different targets (AmtB and DraG). Together with mutagenesis experiments the binary complex structure reveals which structural elements contribute to GlnZ vs. GlnB specificity for DraG. Although the structure does not resolve the mode of DraG regulation with certainty it strongly

suggests steric hindrance as the mechanism for DraG inactivation. DraG belongs to a family of widely distributed and structurally conserved enzymes, the ADP-ribosyl-hydrolases (33). However, despite the ubiquity of these enzymes very little is known about their function and regulation. DraG is the best studied mono-ADP-ribosyl-hydrolase and the only one studied at the structural level whose cognate substrate is known. The identification of the region near *A. brasilense* DraG helix 5 as the binding site of a regulatory protein together with the fact that this helix is present in DraG orthologues may help to elucidate the mechanism of regulation of other ADP-ribosyl-hydrolases.

Materials and Methods

DraG and GlnZ purifications were carried out as described (20). Crystallization, data collection, and structure determination and model building

were carried out using standard protocols. The table of data collection and refinement statistics (Table S2). Biochemical and biophysical characterization of the GlnZ-DraG complex and modelling of a putative DraG-NifH complex are described in detail in *SI Materials and Methods*.

Coordinates and structure factors of the *Azospirillum brasilense* GlnZ-DraG complex with ADP have been deposited in the PDB under ID code 3OST.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Clemens Schulze-Briese from Swiss Light Source for supervising crystallographic data analysis of C.R. respectively. We are grateful to Ana C. Bonatto, Luiza M. Araújo, and Thiago Rodrigues for the gift of the pMSGlnB21 plasmid and the purified HisGlnD and HisAmtB proteins, respectively. Victor E. P. Souza is thanked for helping with some DraG assay experiments. This work was supported by Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Brazil). M.M. acknowledges support from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (United Kingdom).

- Ninfa AJ, Atkinson MR (2000) PI signal transduction proteins. *Trends Microbiol* 8:172–179.
- Arcondoguy T, Jack R, Merrick M (2001) PII signal transduction proteins: pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:80–105.
- Leigh JA, Dodsworth JA (2007) Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu Rev Microbiol* 61:349–377.
- Fordham K (2008) PII signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol* 16:65–72.
- Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ (1998) 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* 37:12782–12794.
- Huergo LF, et al. (2009) In vitro interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. *J Biol Chem* 284:6674–6682.
- Truan D, et al. (2010) A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. *J Mol Biol* 400:531–539.
- Fokina O, Chellamuthu VR, Fordham K, Zeth K (2010) Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synochoccus elongatus* PII signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19760–19765.
- Conroy MJ, et al. (2007) The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1213–1218.
- Llaser JL, et al. (2007) The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17644–17649.
- Mizuno Y, Moorhead GB, Ng KK (2007) Structural basis for the regulation of N-acetylglutamate kinase by PII in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 282:35733–35740.
- Llaser JL, et al. (2010) Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PpX and PII. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15397–15402.
- Zhao MX, et al. (2010) Crystal structure of the cyanobacterial signal transduction protein PII in complex with PpX. *J Mol Biol* 402:552–559.
- Espinosa J, Fordham K, Burillo S, Contreras A (2009) Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PpX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol Microbiol* 61:457–469.
- Zhang Y, Burris RH, Ludden PW, Roberts GP (1997) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 152:195–204.
- Grunwald SK, Lies DP, Roberts GP, Ludden PW (1999) Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum* strains overexpressing the regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase activating glycohydrolase. *J Bacteriol* 177:628–635.
- Saari LL, Triplett EW, Ludden PW (1984) Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* 259:15502–15508.
- Pope MR, Saari LL, Ludden PW (1986) N-glycohydrolase of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* 261:10104–10111.
- Huergo LF, et al. (2005) Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. *Arch Microbiol* 183:209–217.
- Huergo LF, et al. (2006) Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Lett* 258:5232–5236.
- de Zamaroczy M (1998) Structural homologues PII and dP2 of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. *Mol Microbiol* 29:449–463.
- Huergo LF, et al. (2006) ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol Microbiol* 59:326–337.
- Huergo LF, et al. (2007) Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. *Mol Microbiol* 66:1523–1535.
- Pottarion L, et al. (2004) Developments in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr D* 60:2288–2294.
- LIXD, et al. (2009) Crystal structure of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) reveals conservation in the ADP-ribosylhydrolase fold and specific features in the ADP-ribose-binding pocket. *J Mol Biol* 390:737–745.
- Araújo LM, et al. (2004) GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NFA activity in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 155:491–495.
- Zhang Y, Burris RH, Ludden PW, Roberts GP (1999) Comparison studies of dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase/dinitrogenase reductase activating glycohydrolase regulatory systems in *Rhodospirillum rubrum* and *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 177:2354–2359.
- Zhang Y, Pohlmann B, Ludden PW, Roberts GP (2001) Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. *J Bacteriol* 183:6159–6168.
- Wang H, Franke CC, Nordlund S, Noren A (2005) Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*: dependence on GlnI and AmtB1. *FEMS Microbiol Lett* 253:273–279.
- Barthold CL, Wang H, Nordlund S, Hogbom M (2009) Mechanism of ADP-ribosylation removal revealed by the structure and ligand complexes of the dimanganese mono-ADP-ribosylhydrolase DraG. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14247–14252.
- Kim K, Zhang Y, Roberts GP (2004) Characterization of altered regulation variants of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Lett* 259:84–88.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24:487–506.
- Nordlund S (2000) Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. *Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological processes*, ed EW Triplett (Horizon Scientific Press, Wymondham, United Kingdom), pp 149–167.

Supporting Information

Rajendran et al. 10.1073/pnas.1108038108

SI Materials and Methods

Protein Purification and GlnZ-DraG Complex Formation. GlnZ and DraG purifications were carried out as described (1), except that the buffer used for gel filtration of both proteins was 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol. The column used for gel filtration was a Superdex 75 10/300, a manually packed column with bed volume of 24 mL. Purified proteins (GlnZ and DraG) were incubated with 5 mM MgCl₂ and 1 mM ADP at 4 °C overnight. The concentration of the proteins was 0.4 μmol of GlnZ monomer and 0.4 μmol of DraG monomer. The gel filtration of the complex was performed with the same column after incubation and the GlnZ-DraG complex was eluted as a single symmetrical peak.

Crystallization and Data Collection. The complex was concentrated to ~13 mg/mL. Crystallization was setup with drops containing 200 nL of protein and 200 nL of precipitant with various commercially available screens. Screening of crystals was performed using a Hamilton nanoliter-drop-dispensing robot available at the Swiss Light Source (SLS) crystallization facility. Crystals appeared in various conditions. One of the crystals diffracted to about 2.1 Å. Data from a flash-cooled crystal (nitrogen gas stream at 100 K) was collected at the SLS beamline X10SA at a wavelength of 1 Å. The crystal belongs to space group H3. Diffraction data were collected using a rotation angle of 0.5° per image on a MarCCD225 detector. Several datasets were collected and processed using XDS (2, 3). The data were further evaluated using phenix.xtriage and no twinning was detected (4).

Structure Solution and Refinement. The internal processing software go.com was used for data processing, which uses XDS (2), Labelit (5), MOSFLM (6), and phenix.xtriage (4) for further data analysis in turn. Molecular replacement was performed with MOLREP within the CCP4i suite (7) using the high-resolution structures of GlnZ (PDB ID 3MHY) and DraG (PDB ID 3G9D) as search models. Initial refinement was performed using REFMAC (8). The model was further improved in several refinement rounds using automated restrained refinement with the program PHENIX (4) and interactive modelling with COOT (9). ADP was identified in the first electron density map based on molecular replacement phases and was included in the model. The T-loop residues 41–52 appear to be disordered. The final R-factors were 0.157/0.189 for R_{work} and R_{free} , respectively, and refinement statistics are listed in Table S2. The final model was analyzed using the program MolProbity (10). Ramachandran statistics show no outliers. All the figures were prepared using PyMOL (11).

ITC Measurements. In order to minimize the unspecific heat and remove any aggregates, size exclusion chromatography (Superdex 200 10/300 GL column, GE Healthcare) was performed using the very same column and buffer (25 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 10 mM MgCl₂). Concentration of the proteins was measured by UV spectroscopy in 6 M guanidinium hydrochloride (12).

As the ITC instrument is measuring all heats associated with the given reaction it is very important to choose such a condition where only the reaction of interest is taking place, and this is especially the case for reactions where more than two binding partners are involved. Consequently we first oversaturated the GlnZ with ATP, until no reaction heat was observed. Into this solution the DraG was titrated until saturation. To saturate GlnZ with ADP

33.7 μM of protein was titrated with 3 mM ADP. To the saturated protein solution (starting concentration of 30.1 μM GlnZ) was titrated with 650 μM DraG.

All reactions were performed on an iTC₂₀₀ (GE Healthcare) at 25 °C. Data analysis was carried out using Origin 7 (OriginLab) software with the ITC plug-in as supplied by the manufacture.

Construction of the P_{II} Mutant Proteins. The GlnZ mutants D68S, Q69L, and Q39K were obtained using the QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent) using the pMSA4 plasmid as template (1). Mutagenic primers were synthesized accordingly to the manufactures instructions. The mutant plasmids were screened by DNA sequencing of the entire *glnZ* gene.

To construct the gene coding for the GlnZB1 chimera, the *glnZ* coding plasmid pMSA4 was digested with BglII removing 269 bp of the *glnZ* 5' coding region. The *glnB* 5' coding region was removed from pLH25PET plasmid (13) by digestion with BglII and ligated to the previous BglII digested pMSA4. Recombinant plasmids with DNA insert in the correct orientation were screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The plasmid coding for the GlnZB1 chimera was constructed by removing 200 bp the *SacII* / *BamHI* fragment of pMSA4 and exchanging it for the *SacII* / *BamHI* of pLH25PET.

All the P_{II} mutants and the chimeras were expressed in *Escherichia coli* BL21 after IPTG induction and purified using a Hitrap Heparin column as described (1).

Purification of His-AmtB, His-GlnD, and His-DraG. The *Azospirillum brasilense* His-AmtB, His-GlnD, and His-DraG proteins were purified as described (14, 15).

Interaction Assay in Vitro. In vitro protein interaction assays were performed as described with minor modifications (14). All reactions were conducted in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.05% LDAO, 10% glycerol, 20 mM imidazole in the absence or presence of effectors (1 mM ADP or ATP) as indicated. 12.5 μL of Ni²⁺ magnetic beads (Promega) were equilibrated by one wash with 200 μL of buffer. Binding reactions were performed in 500 μL of buffer by adding purified proteins: 10 μg His-DraG or 5 μg His-AmtB and 10 μg P_{II} (wild type or mutants), in this order. After 5 min, beads were washed three times with 300 μL of buffer. Elution was performed with 20 μL of buffer containing 0.5 M imidazole. Eluted samples were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue.

Synthesis of Dansyl-Arginine-ADP-Ribose. Dansyl-arginine-ADP-ribose (DAAR) was synthesized as described previously (16). Commercial dansyl-arginine 3.5 mM (Sigma) was ADP-ribosylated in vitro using 50 μg of purified cholera toxin (Sigma) in phosphate buffer (8.5 g/L of NaCl, 7 g/L of K₂HPO₄, 3 g/L of KH₂PO₄, pH 7.2), containing 15 mM dithiothreitol and 5 mM β-NAD⁺. The reaction was incubated over night at 25 °C. The reaction was monitored by silica thin layer chromatography and by MALDI-TOF mass spectrometry. DAAR was purified by MonoQ anion exchange chromatography (GE-Healthcare). The column was equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8 and eluted with a linear gradient of NaCl in the same buffer. Elution was monitored by absorption at 250 nm, DAAR peaked at 250 mM of NaCl. The most concentrated samples were pooled, diluted in 50 mM Tris-HCl pH 8 and passed again through the MonoQ column. This second passage was necessary to completely eliminate the free dansyl-arginine from DAAR as monitored by TLC

and MALDI-TOF. Quantification of DAAR was performed by Nanodrop spectrophotometry using an extinction coefficient of $20.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ UV 256 nm in formic acid (16).

Determination of DraG Activity. The DraG activity was determined by the release of dansyl-arginine after incubation of the DAAR substrate with the enzyme. Assays were performed in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% LDAO, 1 mM ADP and 20 mM MgCl_2 . 10 ng of DraG was incubated in the presence or absence of 80 ng of GlnZ and 600 ng of His-AmtB. Reactions were equilibrated at 30°C for 5 min and started with the addition of 2 μL of DAAR 208 μM to a final reaction volume of 10 μL . Control reactions were linear until about 25% of the substrate was hydrolyzed which occurred after 10–15 min of incubation. The assays were terminated after 5 min, within the linear range of the reaction, by the addition of 1 μL of 500 mM EDTA pH 8.1 μL of the reaction was spotted twice on a silica TLC plate. All reactions were performed in duplicated tubes.

Separation of DAAR from cleaved dansyl-arginine was performed by TLC using butanol : acetic acid : water (4:1:2) as the mobile phase. Dansyl-arginine was visualized by exposing to UV 365 nm and recording the visible fluorescence using a CCD camera (UVP). Quantification of dansyl-arginine was done using Labworks software (UVP) comparing the fluorescent signal of the reaction products to a standard solution of dansyl-arginine on the same TLC plate. The results reported are average values $\pm$ standard deviation obtained from independent reaction tubes.

Docking of Nitrogenase NifH to DraG. Docking of the NifH dimer [from *Azotobacter vinelandii* nitrogenase complex structure,

1G21; (17)] was done as follows: (i) the R101 side chain of one NifH subunit (R100 in *A. vinelandii* NifH) was covalently linked to ADP-ribose [positioned in DraG as observed in structure 2W0E and with only one Mg^{2+} ion coordinated to the 2'- and 3'-hydroxyls of the ribose; (18)], (ii) the NifH dimer was manually positioned such that steric overlap was avoided at the main chain level, and (iii) the local conformation of selected active site residues including the ADP-ribosylated R101 and the active site Mg^{2+} ion were optimized using a united atoms force field as implemented in Moloc (19).

The goal of this modeling was to examine whether the existence of a ternary NifH-DraG-GlnZ could be ruled out for steric reasons. The NifH docking shown in Fig. 4B is the best model which could be generated as it avoids any main chain overlap of the two proteins (all C α -C α distances $>4 \text{ \AA}$) and maintains covalent linkage of R101 to the ADP-ribose in a stereochemically satisfactory fashion. The ADP-ribosylated R101 side chain was found to have to be in an extended conformation to find candidate solutions with no or moderate DraG-NifH overlap at all. To first approximation all possible docking modes (enabling covalent linkage of R101 to DraG-bound ADP-ribose) are related by rotation of the NifH dimer around the long axis of the modified R101 side chain. In all orientations except two (related by an approximate 180° rotation) larger changes in surface loop main chain structure would be needed to avoid severe steric clashes. Strikingly, all orientations show massive interpenetration of NifH with GlnZ essentially ruling out the possibility of their simultaneous binding independent of the choice of one particular docking orientation.

- Huergo LF, et al. (2007) Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. *Mol Microbiol* 66:1523–1535.
- Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* 26:795–800.
- Zwart PH, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD (2005) Characterization of X-ray datasets. *CCP4 Newsletter* July (Contribution 10).
- Adams PD, et al. (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D* 58:1948–1954.
- Sauter NK, Poon BK (2010) Autoindexing with outlier rejection and identification of superimposed lattices. *J Appl Crystallogr* 43:611–616.
- Leslie AG (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62:48–57.
- Pottart L, et al. (2004) Developments in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2288–2294.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240–255.
- Emsley P, Cowtan K (2004) COOT: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126–2132.
- Davis IW, et al. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W375–383.
- Wl D (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. (DeLano Scientific, San Carlos, CA).
- Bjelic S, Karshikoff A, Jekasarov I (2006) Stability and folding/unfolding kinetics of the homotrimeric coiled coil Lpp-56. *Biochemistry* 45:8931–8939.
- Huergo LF, et al. (2005) Effects of overexpression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent posttranslational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. *Arch Microbiol* 183:209–217.
- Huergo LF, et al. (2009) In vitro interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes: dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. *J Biol Chem* 284:6674–6682.
- Rodriguez TE, et al. (2011) In vitro interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the PII protein GlnZ. *Biochim Biophys Acta* 1814:1203–1209.
- Pope MR, Saari LL, Ludden PW (1986) N-glycohydrolase of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* 261:10104–10111.
- Chiu H, et al. (2001) MgATP-bound and nucleotide-free structures of a nitrogenase protein complex between the Leu 127 Delta-Fe-protein and the MoFe-protein. *Biochemistry* 40:641–650.
- Berthold CL, Wang H, Nordlund S, Hogben M (2009) Mechanism of ADP-ribosylation removal revealed by the structure and ligand complexes of the dimanganese mono-ADP-ribosylhydrolase DraG. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14047–14052.
- Gerber PR, Muller K (1995) MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J Comput Aided Mol Des* 9:251–268.

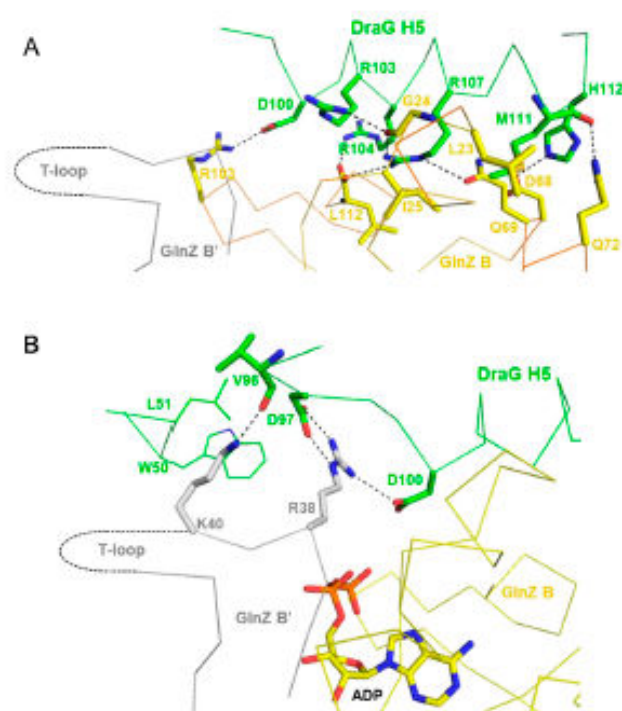


Fig. S1. Detailed interactions between GlnZ and DraG. One DraG monomer (green) interacts with two GlnZ monomers (B and B'). Side and/or main chain atoms of the residues involved in hydrogen bonding and salt bridge contacts (black dashed lines) are shown in stick representation. The disordered GlnZ T-loop is schematically shown as dotted line. (A) Polar contacts between DraG and GlnZ-B (yellow). In addition the hydrophobic contacts of M111 are shown. (B) Contacts between DraG and GlnZ-B' (gray). ADP bound between subunits B and B' is shown in yellow stick representation.

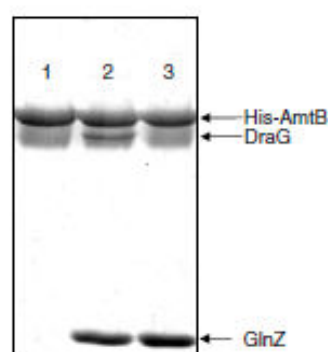


Fig. S2. In vitro ternary complex formation between His-AmtB, GlnZ, and DraG. Complex formation was assessed by coelution from Ni^{2+} beads. Reactions were performed in the presence of 1 mM ADP. Binding reactions were conducted in 500 μL of buffer adding 5 μg of His-AmtB (all lanes), 10 μg of GlnZ (lanes 2 and 3), and 20 μg of DraG (lanes 1 and 2). The eluted fractions were subjected to SDS-PAGE, the gels were silver stained. Arrows indicate the identified proteins.

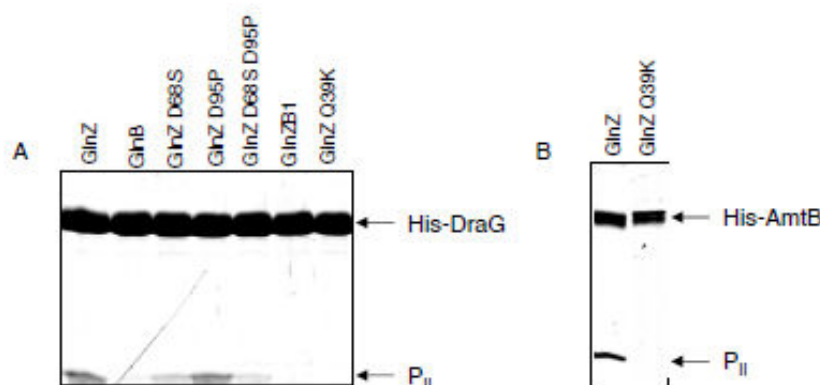


Fig. S3. In vitro interaction between His-DraG (A) or His-AmtB (B) and various P_{II} mutant proteins. Complex formation was assessed by coprecipitation using Ni^{2+} beads. Reactions were performed in the presence of 1 mM ADP. Binding reactions were conducted in 500 μ L of buffer adding 10 μ g of His-DraG (A), or 5 μ g of His-AmtB (B), and 10 μ g of the indicated purified P_{II} protein. The eluted fractions were subjected to SDS-PAGE, the gel was Coomassie blue stained. Arrows indicate the identified proteins.

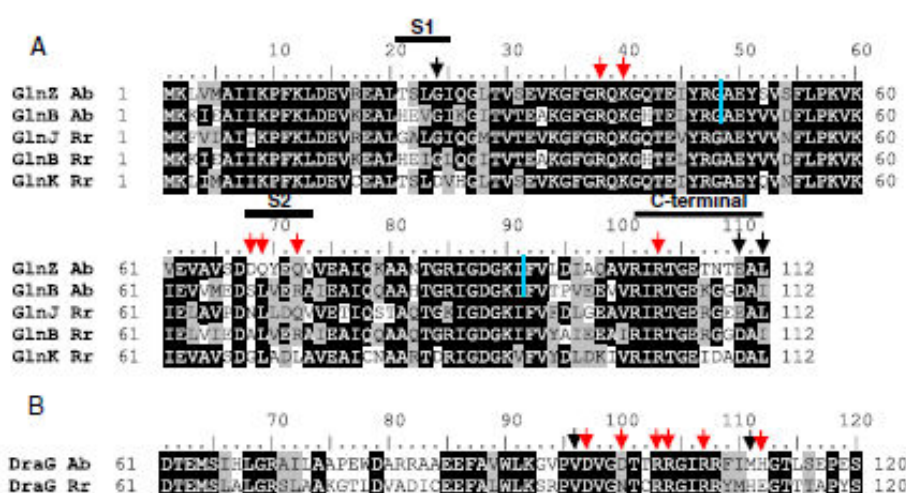


Fig. S4. Clustal W sequence alignment of *A. brasilense* (Ab) and *R. rubrum* (Rr) P_{II} (A) and DraG (B) proteins. Residues involved in polar contacts within the GlnZ-DraG complex are indicated by arrows (red for side chain, black for main chain contacts). Blue bars indicate the position of amino acid exchanges in the engineered chimeric GlnB/GlnZ proteins. *Sac* II cuts between codons for residues 48–49, and *Bgl* II cuts between the codons for residues 91–92. The GlnZ residues participating in DraG interactions are marked with black lines on the top of the sequence alignment, namely S1 (T21–I25), S2 (D68–Q72), and C terminus (R101–L112).

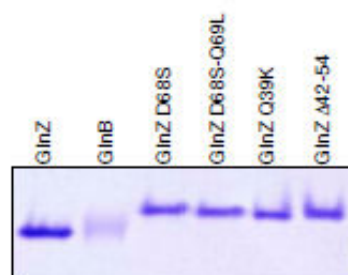


Fig. S5. Native-PAGE analysis of the various P_{II} mutant proteins. 1 μ g of the indicated purified P_{II} was analyzed by Native-PAGE, the gel was Coomassie blue stained.

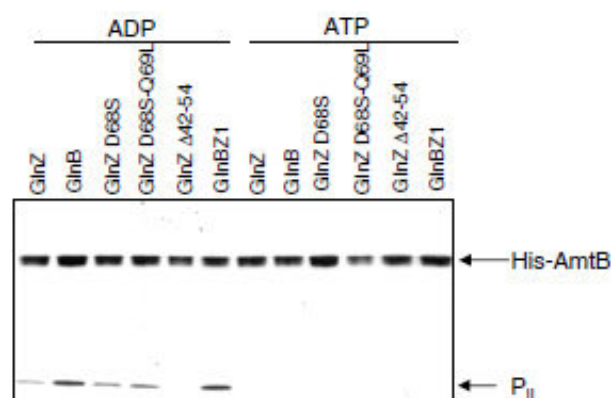


Fig. S6. In vitro interaction between His-AmtB and various P_1 mutant proteins. Complex formation was assessed by coelution from Ni^{2+} beads. Reactions were performed in the presence of 1 mM ADP or ATP as indicated. Binding reactions were conducted in 500 μ L of buffer adding 5 μ g His-AmtB and 10 μ g of the indicated purified P_1 protein. The eluted fractions were subjected to SDS-PAGE, the gels were silver stained. Arrows indicate the identified proteins

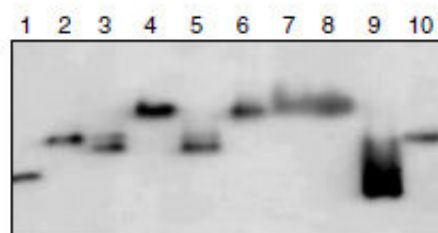


Fig. S7. Native-PAGE analysis and in vitro uridylylation reaction of the various P_1 mutant proteins: GlnZ (lanes 1 and 2), GlnZ D68S Q69L (lanes 3 and 4), GlnZ D68S (lanes 5 and 6), GlnZ Δ 42–54 (lanes 7 and 8), and GlnBZ1 (lanes 9 and 10). Even lanes: purified proteins; Odd lanes: purified proteins after in vitro uridylylation by *A. brasilense* GlnD.

Table S1. Polar contacts mapped in the interface between DraG and GlnZ

Residue (GlnZ monomer B)	Location in GlnZ	Contact residue in DraG	Type of interaction	Homologous contact in <i>R. rubrum</i> GlnJ-DraG
G24 mc*	$\alpha 1\beta 2$	R103	hb [†]	yes
G24 mc*	$\alpha 1\beta 2$	R107	hb [†]	yes
D68	$\beta 2/\alpha 2$	H112	hb [†] /sb [‡]	no N68 - E112
Q69	$\beta 2/\alpha 2$	R107	hb [†]	no L69 in GlnJ
Q72	$\alpha 2$	M111 mc	hb [†]	H111, mc not affected
R103	C-loop	D100	hb [†] /sb [‡]	no N100 in DraG
L112 (C-terminal carboxylate)	C terminus	R104 R107	hb [†] /sb [‡] /hb [†] /sb [‡]	yes
Residue (GlnZ monomer B*)				
K40	T-loop	V96 mc*	hb [†]	yes
R38	T-loop	D97	hb [†] /sb [‡]	yes
R38	T-loop	D100	sb [‡]	no N100 in DraG

*main chain contact.

[†]hydrogen bond.

[‡]salt bridge.

Table S2. Data collection and refinement statistics

Data collection	
Space group	H3
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	115.65, 115.65, 105.65
α , β , γ (°)	90, 90, 120
Resolution (Å)	72-2.09 (2.22-2.09)*
<i>R</i> _{merge} [†]	0.066 (0.210)*
<i>I</i> / σ <i>I</i>	13.75 (2.8)*
Completeness (%)	99.3 (90)*
Redundancy	2.6 (1.4)*
Refinement	
Resolution (Å)	45.25-2.09
No. unique reflections	31,022
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} [‡]	0.157/0.189
No. atoms	
Protein	3,027
Ligand/ion	27/2
Water	393
Average <i>B</i> -factors (Å ²)	26.7
R.m.s. deviations [§]	
Bond lengths (Å)	0.007
Bond angles (°)	1.058
Ramachandran statistics	
Outliers (%)	0.0
Favored (%)	98.2

* The values in parentheses refer to statistics in the highest-resolution bin.

[†] $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an observation and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean value for its unique reflections; summations are over all reflections.

[‡] $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = \sum_h (F_o(h) - F_c(h)) / \sum_h F_o(h)$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. R_{free} was calculated with 5% of the data excluded from the refinement.

[§] rmsd from ideal values.