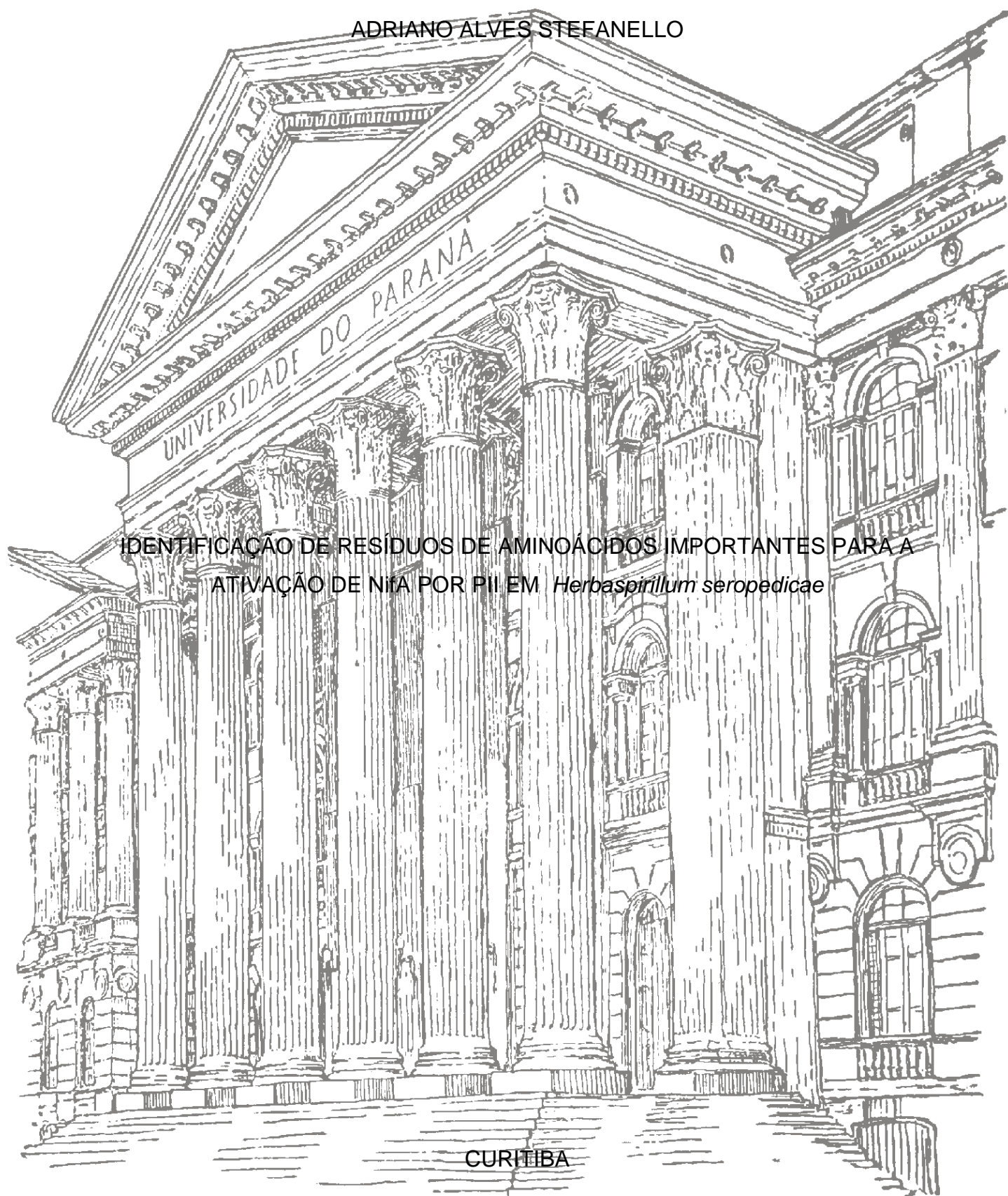


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO ALVES STEFANELLO



IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPORTANTES PARA A  
ATIVACÃO DE NiA POR PII EM *Herbaspirillum seropedicae*

CURITIBA

2014

ADRIANO ALVES STEFANELLO

IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPORTANTES PARA A  
ATIVAÇÃO DE NifA POR PII EM *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica.

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

Co-orientadores: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Marco Aurélio Schuller de Oliveira

CURITIBA

2014

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**ADRIANO ALVES STEFANELLO**


**IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPORTANTES PARA A  
ATIVÇÃO DE NifA POR PII EM *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação aprovada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª Drª Rose Adele Monteiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof Dr Luciano Fernandes Huergo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª Drª Fabiane Gomes de Moraes Rego

Departamento de Análises Clínicas – UFPR

Curitiba, 17 de fevereiro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro, pela disposição e paciência para orientar o meu trabalho ao longo desses anos. Agradeço também aos professores Emanuel Maltempi de Souza e ao Dr. Marco Aurélio Schuller de Oliveira, por seu trabalho de co-orientação.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), e a todos os demais integrantes do NFN pelo apoio constante. Agradeço especialmente ao Valter e à D. Roseli Prado, técnicos no NFN, pela dedicação constante a fazer o laboratório funcionar bem para todos.

Aos colegas de laboratório (todos eles), meu especial agradecimento pela paciência e pelo auxílio.

À minha família, pelo suporte de valor imaterial e incalculável que dela recebo desde que vim ao mundo.

Por fim, agradeço às agências financiadoras pela bolsa concedida (PIBIC-CNPq) e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto (CNPq, Institutos do Milênio, INCT-FBN e Fundação Araucária), e ao programa de pós-graduação em Ciências – Bioquímica, pela oportunidade de realizar esse trabalho de mestrado.

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* ( $\beta$ -Proteobacteria) é um diazotrofo encontrado em associação com gramíneas de interesse econômico, como milho e cana-de-açúcar. A fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* é controlada a nível transcricional pela proteína NifA. NifA é inativa sob alta concentração de nitrogênio fixado, e essa sensibilidade é atribuída ao domínio N-terminal. A desrepressão de NifA depende da interação de seu domínio N-terminal com a proteína GlnK, pertencente à família das proteínas PII, mas os mecanismos dessa interação ainda não foram elucidados. Neste trabalho, foram construídos plasmídeos capazes de co-expressar a proteína NifA e diferentes proteínas PII de *H. seropedicae*, *Escherichia coli*, e *Azospirillum brasilense* a partir do promotor T7. A capacidade dessas proteínas PII de ativar NifA foi medida em *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pRT22 (*nifH::lacZ*) através do ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados mostraram que GlnB dos três organismos e GlnK de *H. seropedicae* foram capazes de ativar NifA, ao passo que GlnZ de *A. brasilense* não o foi. Uma série de mutantes pontuais de GlnK de *H. seropedicae* foi construída, substituindo resíduos conservados em GlnB e GlnK pelos resíduos equivalentes em GlnZ de *A. brasilense*; a avaliação de atividade revelou que mutações na região C-terminal da proteína não aboliram a ativação de NifA por GlnK, indicando que essa região não deve ser responsável pela ativação. Outras proteínas GlnK mutantes incapazes de modificação pós-traducional (Y51F) e de ligação a ATP/ADP (G89A) foram avaliadas conforme já descrito. GlnK G89A é incapaz de ativar NifA em quaisquer condições testadas, ao passo que GlnK Y51F ativa fracamente NifA, e apenas em baixas concentrações de nitrogênio. A ativação de NifA por GlnK Y51F aumenta conforme o aumento de expressão desta. Variantes de GlnK contendo mutações que afetam a região de ligação a efetores também apresentaram diminuição da ativação de NifA. Isso sugere que a ligação de efetores a PII é essencial para a ativação de NifA, e que a uridililação não é essencial para a ativação.

Palavras chave: NifA, PII, *Herbaspirillum seropedicae*

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* ( $\beta$ -Proteobacteria) is a diazotroph found associated with economically important grasses. Nitrogen fixation on this organism is transcriptionally controlled by the enhancer binding protein NifA. NifA is inactive under high concentrations of fixed nitrogen, and this inhibition is attributed to its N-terminal GAF domain. Relief of inhibition is achieved through interaction with GlnK, a PII protein; yet the mechanisms of such activation are not currently understood. Here, we constructed plasmids which coexpress NifA and different PII proteins from *H. seropedicae*, *Escherichia coli*, and *Azospirillum brasilense* from a T7 promoter. The plasmids were transformed in *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) harbouring (*nifH::lacZ*) and  $\beta$ -galactosidase was determined after inducing expression with IPTG. GlnB from all the three organisms and GlnK from *H. seropedicae* were able to activate NifA, whereas GlnZ from *A. brasilense* was not. A series of point mutations was inserted in the *glnK* gene in order to change the aminoacids conserved among NifA-activating PII for those of GlnZ. Activity evaluation revealed that mutations on the C-terminal of PII did not compromise or reduce NifA activation, thus showing that region not to be involved in this process. Other GlnK mutants which could not be uridililated (Y51F) or bind ATP/ADP (G89A) were evaluated as described. GlnK G89A cannot activate NifA in any tested condition, and GlnK Y51F can activate NifA weakly under low nitrogen concentration. NifA activation by GlnK Y51F is enhanced by overexpression of both proteins. GlnK proteins with mutations on the effector binding pocket also showed diminished NifA activation. These data suggest that effector binding to PII is essential to NifA activation, whereas uridililation of PII is not.

Keywords: NifA, PII, *Herbaspirillum seropedicae*

**LISTA DE ABREVIATURAS**

2OG	2-oxoglutarato
AAA+	ATPases associadas a várias atividades celulares
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
Ap <sup>R</sup>	Resistência a ampicilina
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
Cm <sup>R</sup>	Resistência a cloranfenicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dNTP(s)	desoxinucleotídeo(s) trifosfato
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
GDH	Glutamato desidrogenase
GS	Glutamina sintetase
GOGAT	Glutamato sintase
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosídeo
Km <sup>R</sup>	Resistência a kanamicina
MCSI	Sítio de policlonagem I (do vetor pETDuet1)
MCSII	Sítio de policlonagem II (do vetor pETDuet1)
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
ONPG	orto-nitrofenil- $\beta$ -galactosídeo
Rpm	Rotações por minuto
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UMP	uridina monofosfato
UTP	uridina trifosfato
UVC	Luz ultravioleta C (254nm)
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA GlnK DE <i>E. coli</i> .....	8
FIGURA 2 – CONTROLE DO ESTADO DE URIDILILAÇÃO DE PII POR GlnD. ....	10
FIGURA 3 – MECANISMO GERAL DE CONTROLE DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM <i>E. coli</i> .....	12
FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENES <i>Nif</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SUAS REGIÕES PROMOTORAS. ....	13
FIGURA 5– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NIFA DE <i>H. seropedicae</i> .....	16
FIGURA 6 – MODELO PROPOSTO PARA A ATIVAÇÃO DE PROTEÍNAS AAA+ QUE POSSUEM DOMÍNIO GAF N-TERMINAL. ....	16
FIGURA 7 – REGULAÇÃO DE NIFA DE <i>H. seropedicae</i> .....	19
FIGURA 8 – ESQUEMA DE MUTAGÊNESE DIRIGIDA POR OLIGONUCLEOTÍDEOS. ....	33
FIGURA 9 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO NIFA E DIFERENTES PROTEÍNAS PII. ....	43
FIGURA 10 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa E GlnK EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIO.....	44
FIGURA 11– ELETROFORESE EM GEL NATIVO 12% DE 10 $\mu$ G DE EXTRATO DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa OU N185 E GlnK EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO .....	45
FIGURA 12 – ALINHAMENTO DE PROTEÍNAS PII DE <i>H. seropedicae</i> , <i>E. coli</i> , E <i>A. brasilense</i> . ....	46
FIGURA 13 – ALINHAMENTO DE PROTEÍNAS PII DE <i>H. seropedicae</i> , <i>E. coli</i> , E <i>A. brasilense</i> , COMPARANDO AS DEMAIS PII À PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> . ....	46
FIGURA 14 – MODELO ESTRUTURAL DE GlnZ DE <i>A. brasilense</i> , COM OS RESÍDUOS CONSERVADOS ENTRE GlnB DE <i>H. seropedicae</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. brasilense</i> , E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> , MAS NÃO CONSERVADOS EM GlnZ DE <i>A. brasilense</i> MOSTRADOS EM DIFERENTES CORES.....	47
FIGURA 15 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa E DIFERENTES MUTANTES PONTUAIS DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i> . ....	49
FIGURA 16 – ELETROFORESE DE EXTRATOS DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa E MUTANTES PONTUAIS DE GlnK DE <i>H. seropedicae</i> EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE. ....	50
FIGURA 17 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa, GlnK, E GlnK Y51F COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG.....	51
FIGURA 18 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa E DIFERENTES MUTANTES PONTUAIS ALEATÓRIOS DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i> .....	54
FIGURA 19 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO Nifa E ALGUNS MUTANTES PONTUAIS ALEATÓRIOS DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i> EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES DE IPTG.....	55
FIGURA 20 – ELETROFORESE DE EXTRATOS DE <i>E. coli</i> JM109(LDE3) EXPRESSANDO Nifa E MUTANTES PONTUAIS DE GlnK DE <i>H. seropedicae</i> EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE. ....	56
FIGURA 21 – MODELO DE GlnZ DE <i>A. brasilense</i> , COM OS RESÍDUOS MUTAGENISADOS ALEATORIAMENTE MARCADOS COM CORES DIFERENTES .....	57
FIGURA 22 – MODELO DE GlnZ DE <i>A. brasilense</i> , MOSTRANDO A REGIÃO DE LIGAÇÃO A ATP/ADP E 2OG, COM OS RESÍDUOS MUTAGENISADOS MARCADOS COM CORES DIFERENTES .....	58
FIGURA 23 – MODELO DE GlnZ DE <i>A. brasilense</i> , COM OS RESÍDUOS DA REGIÃO DE INTERAÇÃO CCOM 2OG MUTAGENISADOS MARCADOS COM CORES DIFERENTES .....	59

FIGURA 24 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO GlnK E VARIANTES N-TRUNCADAS DE NifA DE <i>H. seropedicae</i> .....	60
FIGURA 25 – ANÁLISE POR SDS-PAGE DE FRAÇÕES DA PURIFICAÇÃO DE hisN185. ....	62
FIGURA 26 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12% DESNATURANTE DE FRAÇÕES DA ANÁLISE DE hisN185 POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO. ....	63
FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE hisN185 POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO. ....	63
FIGURA 28 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA COLUNA SUPEROSE 12 10/300. ....	64
FIGURA 29 – ANÁLISE SDS-PAGE DE FRAÇÕES DA PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DE G185his.....	65
FIGURA 30 – ANÁLISE SDS-PAGE DE FRAÇÕES DA SEGUNDA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DE G185his.....	66
FIGURA 31 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE DE FRAÇÕES DA ANÁLISE DE G185his. ....	67
FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE G185his POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO. ....	67
FIGURA 33 - CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE G185his, hisN185, E UMA MISTURA DAS DUAS PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO EM UMA COLUNA DE SUPEROSE 12 10/300. ....	68
FIGURA 34 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE DE PRODUTOS DE LIGAÇÃO CRUZADA ENTRE G185his E hisN185.....	69
FIGURA 35 – GEL DE ELETROFORESE NÃO DESNATURANTE DE GlnK E DOS DOMÍNIOS DE NifA. ....	71
FIGURA 36 – ANÁLISE SDS-PAGE DO ELUATO DOS EXPERIMENTOS DE PULL DOWN USANDO G185his, GlnK, E GlnK-UMP <sub>3</sub> .....	72
FIGURA 37 – ANÁLISE SDS-PAGE DO ELUATO DOS EXPERIMENTOS DE PULL DOWN USANDO hisN185, GlnK, E GlnK-UMP <sub>3</sub> .....	72
FIGURA 38 – ANÁLISE SDS-PAGE DO ELUATO DOS EXPERIMENTOS DE PULL DOWN USANDO G185his, hisN185, GlnK, E GlnK-UMP <sub>3</sub> .....	73
FIGURA 39 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE DE PRODUTOS DE LIGAÇÃO CRUZADA ENTRE G185his E GlnK.....	75

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	21
TABELA 2 – MEIOS DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i> .....	27
TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS.....	28
TABELA 4 – PRIMERS DESENHADOS E SINTETIZADOS PARA USO NESTE TRABALHO.....	30
TABELA 5 – PRIMERS DESENHADOS EM TRABALHOS ANTERIORES.....	31
TABELA 6 – SISTEMA DE REAÇÃO PARA SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	32
TABELA 7 – GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (RECEITA PARA DOIS GÉIS).....	37
TABELA 8 – GEL PARA ELETROFORESE NATIVA (RECEITA PARA DOIS GÉIS).....	37
TABELA 9 – VARIANTES DO GENE <i>glnK</i> OBTIDAS POR MUTAGÊNESE ALEATÓRIA.....	53

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> .....	3
1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO .....	4
1.2.1. <i>Nitrogenase e genes nif</i> .....	5
1.3. METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTERIAS .....	5
1.3.1. <i>Assimilação de amônio</i> .....	6
1.3.2. <i>Regulação global do metabolismo de nitrogênio pelo sistema Ntr</i> .....	9
1.3.3. <i>Proteínas PII</i> .....	7
1.3.4. <i>Regulação da FBN em H. seropedicae</i> .....	13
1.4. PROTEÍNA NIFA.....	14
1.5. JUSTIFICATIVA .....	20
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. REAGENTES.....	21
3.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	21
3.3. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	27
3.4. ANTIBIÓTICOS .....	28
3.5. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> QUIMIOCOMPETENTE .....	28
3.6. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> ELETROCOMPETENTE .....	29
3.7. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	29
3.7.1. <i>Edição e análise de seqüências</i> .....	29
3.7.2. <i>Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)</i> .....	30
3.7.3. <i>Visualização de estruturas de proteínas</i> .....	31
3.8. MANIPULAÇÃO DO DNA .....	32
3.8.1. <i>Amplificação do DNA</i> .....	32
3.8.2. <i>Amplificação mutagênica do DNA</i> .....	32
3.8.3. <i>Mutagênese sítio-dirigida</i> .....	33
3.8.4. <i>Seqüenciamento do DNA</i> .....	34
3.8.5. <i>Digestão com endonucleases de restrição</i> .....	34
3.8.6. <i>Ligação de fragmentos de DNA</i> .....	34
3.8.7. <i>Extração de DNA plasmidial</i> .....	35
3.8.8. <i>Análise eletroforética do DNA</i> .....	35
3.8.9. <i>Preparação dos vetores para ligação</i> .....	35
3.8.10. <i>Preparação de vetor pTZ57R para clonagem TA</i> .....	35
3.8.11. <i>Quantificação do DNA por espectrofotometria</i> .....	35
3.9. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE EM <i>E. COLI</i> .....	36
3.10. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	36
3.10.1. <i>Determinação da concentração de proteínas</i> .....	36
3.10.2. <i>Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)</i> 37	37
3.10.3. <i>Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida não desnaturante</i> .....	37
3.10.4. <i>Expressão e purificação de hisN185</i> .....	38
3.10.5. <i>Expressão e purificação de G185his</i> .....	38
3.10.6. <i>Expressão e purificação de GlnK de H. seropedicae</i> .....	39
3.10.7. <i>Análise de proteínas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)</i> .....	39
3.10.8. <i>Ensaio de ligação cruzada (crosslinking) in vitro</i> .....	40
3.10.9. <i>Ensaio de pull-down</i> .....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
4.1. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES PROTEÍNAS PII SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. SEROPEDICAE</i> .....	41

4.1.1.	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DNIFA, DHsGLNK, E DN185 .....	41
4.1.2.	<i>Subclonagem de genes de diferentes proteínas PII em DNifA</i> .....	41
4.1.3.	<i>Subclonagem de genes de diferentes proteínas PII em DN185</i> .....	42
4.1.4.	<i>Construção do plasmídeo HsdeltaTglnKDNifA</i> .....	42
4.1.5.	<i>Determinação da atividade de NifA coexpressa com proteínas PII</i> .....	43
4.2.	ALINHAMENTO DE PII .....	46
4.3.	CONSTRUÇÃO DE MUTANTES PONTUAIS DE GLNK DE <i>H. SEROPEDICAE</i> .....	48
4.4.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NIFA COEXPRESSA COM PROTEÍNAS GLNK CONTENDO MUTAÇÕES PONTUAIS .....	48
4.5.	CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE <i>GLNK</i> DE <i>H.</i> <i>SEROPEDICAE</i> .....	52
4.6.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE VARIANTES DA PROTEÍNA NIFA COEXPRESSAS COM GLNK .....	59
4.6.1.	<i>Subclonagem de variantes do gene NifA em DHsGLNK</i> .....	60
4.6.2.	<i>Determinação da ativação de variantes de NifA por GlnK</i> .....	60
4.7.	INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO GAF DE NIFA E A PROTEÍNA NIFA $\Delta$ GAF .....	61
4.7.1.	<i>Purificação de hisN185 (<math>\Delta</math>GAF)</i> .....	61
4.7.2.	<i>Purificação de G185his</i> .....	64
4.7.3.	DETECÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE G185HIS E HISN185 POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO 68	
4.7.4.	DETECÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE G185HIS E HISN185 POR LIGAÇÃO CRUZADA .....	69
4.8.	INTERAÇÃO ENTRE OS DOMÍNIOS DE NIFA E GLNK OU GLNK-UMP <sub>3</sub> .....	70
4.8.1.	<i>Detecção da interação entre os domínios de NifA e GlnK por eletroforese não desnaturante</i> .....	70
4.8.2.	<i>Detecção da interação entre os domínios de NifA e GlnK por ensaios de pull-down</i> .....	71
4.8.3.	<i>Detecção da interação entre o domínio GAF de NifA e GlnK por ligação cruzada</i> .....	73
<b>CONCLUSÕES</b> .....		<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Herbaspirillum seropedicae*

*H. seropedicae* é um microrganismo diazotrófico Gram negativo pertencente à classe  $\beta$  das Proteobactérias (BALDANI *et al.*, 1986). *H. seropedicae* é encontrado em associação com gramíneas de interesse econômico, como milho e cana-de-açúcar (SCHMID *et al.*, 2006), e também foi isolado de plantas não gramíneas, com o abacaxizeiro (CRUZ *et al.*, 2001).

O gênero *Herbaspirillum* (Burkholderiales; Oxalobacteriaceae) compreende 15 espécies correntemente descritas: *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2006), *H. chlorophenicum* (IM *et al.*, 2004), *H. autotrophicum* (DING e YOKOTA, 2004), *H. huttense* (DING e YOKOTA, 2004) ssp *huttense* e ssp *putei* (DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006), *H. rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007), *H. aquaticum* (DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. aurantiacum* (CARRO *et al.*, 2011), *H. canariense* (CARRO *et al.*, 2011), *H. soli* (CARRO *et al.*, 2011), *H. chemoriales* (LU e SHI, 2013), e *H. psychrotolerans* (BAJERSKI *et al.*, 2013), além de diversos isolados ainda pouco caracterizados. Seis espécies (*H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. hiltneri*, e *H. rhizosphaerae*) são encontradas na rizosfera ou em associação com monocotiledôneas. *Herbaspirillum seropedicae* é um microrganismo diazotrofo não-patogênico, encontrado na rizosfera e no interior de vasos xilêmáticos (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Suas células possuem de 0,6 a 0,7 micrômetros de comprimento, têm morfologia vibríóide, com 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos. Isolado pela primeira vez a partir da rizosfera e das raízes de sorgo, milho e arroz (BALDANI *et al.*, 1986), *H. seropedicae* também foi encontrado em cana-de-açúcar (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 1999), capim-elefante (OLIVARES *et al.*, 1996), banana e abacaxi (CRUZ *et al.*, 2001; WEBER *et al.*, 1999).

*H. seropedicae* é considerado promotor de crescimento vegetal (PGPR). Diversos estudos demonstraram seu potencial como biofertilizante (BODDEY e DOBEREINER, 1995; GYANESHWAR *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2002). *H. seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio em condição de microaerobiose e baixa concentração de nitrogênio fixado (FU e BURRIS, 1989), e de produzir giberelina A3 e ácido indol-3-acético (BASTIAN *et al.*, 1998). Essas duas características podem estar relacionadas ao aumento da biomassa de culturas inoculadas com *H. seropedicae*, conforme verificado em alguns cultivares de milho (DOTTO *et al.*, 2010; RIGGS *et al.*, 2001), arroz (BALDANI *et al.*, 2000; GYANESHWAR *et al.*, 2002), trigo (el-KOMY *et al.*, 2003).

Os genes *nif* de *H. seropedicae*, que codificam proteínas relacionadas à fixação de nitrogênio, são transcritos in planta (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), e a bactéria é capaz de fixar nitrogênio no tecido vegetal enquanto houver abundância de carbono disponível (GYANESHWAR *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2002). Outros estudos mostraram a presença de grande quantidade de nitrogênio proveniente da atmosfera em plantas inoculadas com *H. seropedicae*, se comparadas a controles não inoculados (BALDANI *et al.*, 2000; el-KOMY *et al.*, 2003; JAMES *et al.*, 2002). Entretanto, o papel da produção de fitormônios não deve ser ignorado, uma vez que *H. seropedicae* promove o crescimento vegetal mesmo em cultivos fertilizados com nitrogênio, e foi verificada a produção de ácido indol-3-acético pela bactéria quando cultivada em excesso de amônio (SCHWAB, 2006).

A simbiose com *H. seropedicae* pode ser benéfica também para outros aspectos do desenvolvimento vegetal; ARAÚJO e colaboradores (2010) demonstraram que a inoculação com *H. seropedicae* tem efeito sobre a velocidade de germinação de arroz.

## 1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O gás nitrogênio compõe cerca de 78% da atmosfera terrestre, mas não é assimilável pela maioria dos organismos devido à sua baixa reatividade (KIM e REES, 1994). Apenas alguns procariontes (denominados diazotrofos) são capazes de converter o nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) a amônio ( $NH_4^+$ ), um produto de mais fácil assimilação metabólica (RAYMOND *et al.*, 2004). Essa reação, denominada Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (BURRIS, 1991).

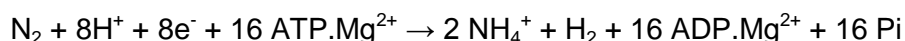
A FBN é responsável por cerca de 50 – 60% de todo o nitrogênio fixado anualmente na terra (KIM e REES, 1994; VITOUSEK *et al.*, 1997), sendo um processo vital para a manutenção do ciclo do nitrogênio. Também é vista com interesse por suas aplicações na agricultura, pois o nitrogênio é um nutriente limitante nos solos cultivados (DIXON e KAHN, 2004). A deficiência de nitrogênio é geralmente suprida com o uso de fertilizantes contendo amônio produzido pelo processo de Haber-Bosch (CREWS e PEOPLES, 2004), que requerem alto consumo de energia para sua produção (KIM e REES, 1994), e cuja aplicação tem sérias implicações ambientais (CREWS e PEOPLES, 2004; DIXON e KAHN, 2004; GILLER e CADISCH, 1995). Nesse cenário, perspectivas de expansão do uso da FBN na agricultura representam um avanço considerável em direção à sustentabilidade (GILLER; CADISCH, 1995), devido ao baixo custo financeiro e ambiental em relação ao processo industrial.

A eficiência do uso da FBN na agricultura é comprovada por muitos exemplos bem-sucedidos, particularmente com bactérias do gênero *Rhizobium* associadas a leguminosas; a FBN é em grande parte responsável pelo sucesso das lavouras de soja nos últimos anos no Brasil (DOBEREINER, 1997). Não se deve esquecer, porém, o aumento de produtividade

de culturas de cereais e outras gramíneas cultivadas na presença de diazotrofos associativos (BALDANI *et al.*, 1987; BODDEY *et al.*, 1995; KAPULNIK *et al.*, 1983).

### 1.2.1. Nitrogenase e genes *nif*

A estequiometria da reação de redução do dinitrogênio a amônio foi determinada por Simpson e Burris (1984), que propuseram a equação abaixo para explicar o processo:



A redução do dinitrogênio tem um alto custo energético para a célula (16 mols de ATP para cada mol de  $\text{N}_2$  reduzido). Além de dispendiosa, a reação é bastante lenta, com *turnover* de ~5 segundos (DIXON e KAHN, 2004), e só pode ocorrer na ausência de oxigênio, devido à sensibilidade do cofator de Ferro-molibdênio (FeMoco) da nitrogenase (SHAH e BRILL, 1977). Por fim, a fixação biológica de nitrogênio requer grande concentração da enzima nitrogenase (10 – 20% do total de proteína celular). Por todos esses fatores, a fixação biológica de nitrogênio é estritamente regulada em todos os organismos diazotrofos (MA e LUDDEN, 2001).

O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas distintas: a proteína Fe (NifH), ou dinitrogenase redutase, e a proteína FeMo, ou dinitrogenase (NifDK) (HOWARD e REES, 1996), codificadas pelo operon *nifHDK*. A atividade catalítica é exclusiva da proteína FeMo, mas é dependente da redução de FeMo pela proteína Fe (BURRIS, 1991).

Embora os genes *nifHDK* sejam bastante conservados, a capacidade de fixar nitrogênio está presente em organismos filogeneticamente muito distantes como proteobactérias, cianobactérias e arqueias (RAYMOND *et al.*, 2004; ZEHR *et al.*, 2003), e a regulação do processo de fixação ocorre através de mecanismos distintos (DIXON e KAHN, 2004). Sugere-se que essa distribuição filogenética esparsa dos genes *nif* seja resultado da perda de genes *nif* presentes em um ancestral metanogênico, seguida de transferência horizontal de genes para linhagens bacterianas (RAYMOND *et al.*, 2004; ZEHR *et al.*, 2003).

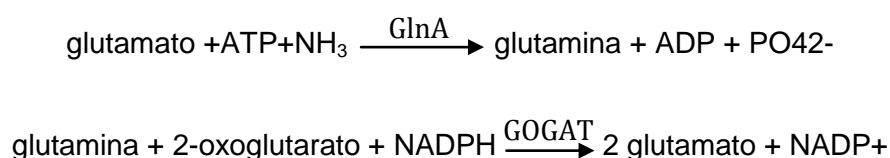
Os genomas de todos os diazotrofos contêm também genes que codificam outras proteínas necessárias à maturação da nitrogenase, especialmente no tocante à produção de seu cofator de Ferro-molibdênio (DIXON e KAHN, 2004; RAYMOND *et al.*, 2004). Esse conjunto de genes recebeu a designação de genes *nif* (nitrogen fixation). Os genes *nif* têm expressão controlada em todos os organismos diazotróficos, e esse controle garante que a expressão da nitrogenase só ocorrerá em condições favoráveis à fixação de nitrogênio.

## 1.3. METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTERIAS

O nitrogênio é o terceiro elemento mais abundante presente nas células, e freqüentemente é limitante para o crescimento microbiano. A regulação adequada de seu metabolismo é de grande importância para maximizar o crescimento sob diferentes disponibilidades desse elemento (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). O metabolismo de nitrogênio é o conjunto de reações efetuadas pela célula para assimilar nitrogênio do meio e incorporá-lo às estruturas celulares (MERRICK e EDWARDS, 1995). Mesmo considerando a diversidade de compostos nitrogenados passíveis de utilização disponíveis no ambiente (como exemplo, vide BRUHN *et al.*, 1987) e sintetizados pela célula, algumas vias comuns são utilizadas por todas as bactérias para a execução dessas duas tarefas essenciais.

### 1.3.1. Assimilação de amônio

O amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) é a molécula preferencial para a obtenção de nitrogênio em bactérias (MERRICK e EDWARDS, 1995), e o composto comum a muitas rotas de assimilação de compostos nitrogenados; nitrato, nitrito, e compostos orgânicos devem primeiramente ser convertidos em amônio para poderem ser aproveitados (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). O amônio é também o produto final da reação de redução do dinitrogênio catalisada pelo complexo da nitrogenase (SIMPSON e BURRIS, 1984) nos organismos diazotróficos. Além disso, o amônio ocupa um importante lugar no monitoramento da concentração extracelular de nitrogênio, que é determinante para a mudança do metabolismo de alto para baixo nitrogênio (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). Sua incorporação ao metabolismo celular ocorre com a transferência do nitrogênio da molécula de amônio para uma molécula de 2-oxoglutarato, gerando como produto final glutamato. A reação é catalisada em duas etapas pelas enzimas glutamina-sintetase (GS, ou GlnA) e glutamato sintase (GOGAT), conforme mostrado abaixo:



Em *E. coli*, a primeira etapa é inibida pela adenililação da proteína GlnA em resposta a altas concentrações de amônio (BROWN *et al.*, 1971); em outros organismos, a modificação da atividade ocorre por ADP-ribosilação (LIU e KAHN, 1995; MERRICK e EDWARDS, 1995; WOEHLER *et al.*, 1990). A proteína GlnA é um dodecâmero, cujos 12 monômeros podem ser modificados independentemente (WOEHLER *et al.*, 1990). A modificação de GlnA é catalisada pela proteína GlnE (ou ATase); em *E. coli*, a região C-terminal dessa proteína é responsável pela adenililação, e a porção N-terminal, pela

remoção do AMP da proteína GlnA. GlnE interage com as proteínas PII, importantes transdutoras de sinal no metabolismo de nitrogênio (JAGGI *et al.*, 1997).

Uma segunda via de assimilação utiliza a enzima glutamato desidrogenase GDH, que catalisa a formação de glutamato a partir de 2-oxoglutarato e  $\text{NH}_4^+$  em uma única etapa, como abaixo:



Em *E. coli*, a via GS-GOGAT é empregada em ambientes com muita energia disponível, ao passo que a via de GDH, menos eficiente, é utilizada em condições limitantes de nitrogênio quando há também baixa disponibilidade de energia (HELLING, 1998). O glutamato produzido serve como intermediário para as demais vias metabólicas de síntese de compostos nitrogenados (SIMS e FOLKES, 1964).

Além de ser produzido pelo metabolismo de compostos nitrogenados e/ou pela fixação biológica do nitrogênio, o amônio pode ser assimilado do ambiente. Isso pode ocorrer simplesmente por difusão através da membrana (MERRICK e EDWARDS, 1995); porém, transportadores de alta afinidade têm um papel fundamental quando a concentração desse íon é baixa, sendo encontrados em grande número de procariontes (NOINDORF, 2006).

### 1.3.2. Proteínas PII

As proteínas da família PII são proteínas triméricas sensoras dos níveis intracelulares de carbono, relação ATP/ADP, e nitrogênio, que possuem um papel fundamental na resposta a níveis intracelulares de nitrogênio. Essa família de proteínas está presente em arqueias, bactérias e plantas (RADCHENKO e MERRICK, 2011). GlnB está presente em bactérias (LEIGH e DODSWORTH, 2007) e é altamente conservada entre as diferentes espécies (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001), o que é indicativo de sua importância fisiológica.

Diversos organismos, entre eles *H. seropedicae*, produzem também uma proteína paróloga, GlnK, co-transcrita com o transportador de amônio AmtB (BENELLI *et al.*, 1997). Em *E. coli*, GlnB é expressa constitutivamente, mas a expressão de GlnK e AmtB é regulada por amônio via NtrC (LEIGH e DODSWORTH, 2007). A diferença funcional entre as duas proteínas pode ser atribuída em grande parte a seu nível de expressão na célula (ATKINSON *et al.*, 2002).

Outros organismos, como *Azospirillum brasilense*, possuem outra proteína tipo PII denominada GlnZ (ou Pz) (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996; de ZAMAROCZY, 1998). O gene *glnZ* é um gene parálogo de PII que não é co-transcrito com o transportador de amônio

amtB, embora em *A. brasilense* GlnZ possa interagir com AmtB tal qual em *E. coli* GlnK interage com AmtB (RODRIGUES *et al.*, 2011). Aparentemente, GlnZ não possui sobreposição de função com GlnB.

Estruturalmente, as proteínas PII apresentam uma organização predominantemente trimérica. A superfície de interação entre os monômeros é determinada pelos resíduos 30, 32, 34, 93, 95 e 98, que no entanto não são perfeitamente conservados entre as PII (XU *et al.*, 1998). Todas as proteínas PII estudadas possuem três voltas, denominadas T-loop (resíduos 37–55), B-loop (resíduos 82–88), e C-loop (resíduos 102–105) (TRUAN *et al.*, 2010). O sítio de ligação a efetores é formado na interface entre as subunidades, com contribuições do B-loop de um monômero e do C-loop do monômero adjacente (XU *et al.*, 1998). A região C-terminal das proteínas PII é menos conservada, e parece apresentar certa diferença estrutural entre diferentes PII (XU *et al.*, 1998). O T-loop é uma região pouco ordenada, que contém o resíduo Y51 que pode ser modificado por uridililação. A Figura 1 mostra a estrutura da proteína GlnK de *E. coli* destacando as principais características das proteínas PII.

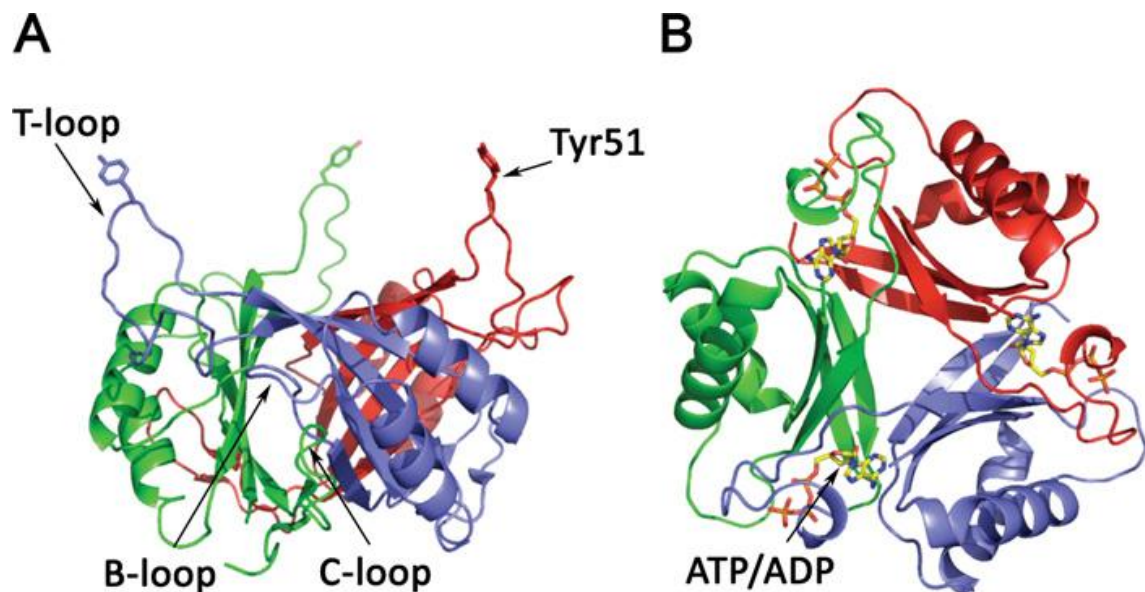


FIGURA 1 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA GlnK DE *E. coli*. Cada monômero está respresentado em uma cor diferente. (A), vista lateral do trímero, mostrando os loops B e C na interface entre dois monômeros, e o T-loop. Note-se que este último compreende um grande trecho da proteína, sendo pouco estruturado e bastante flexível. A cadeia lateral do resíduo Y51, que pode ser modificado por uridililação, está destacada na figura. (B), vista da face oposta ao T-loop, mostrando a localização das moléculas de ATP/ADP em cada interface entre dois monômeros. Fonte: RADCHENKO e MERRICK, 2011.

As proteínas PII são capazes de ligar-se a ATP, ADP, e 2-oxoglutarato (2OG), e, em Proteobacteria, podem ser modificadas por uridililação em um resíduo de tirosina-51 conservado (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). Em *E. coli*, a ligação de ATP e 2OG é sinérgica: não há ligação específica de 2OG na ausência de ATP, e a presença de 2OG,

por sua vez, aumenta a afinidade de PII por ATP (KAMBEROV *et al.*, 1995). Nesse mesmo organismo, há cooperação negativa na ocupação dos três sítios de ligação a efetores (JIANG e NINFA, 2007). Os resíduos G87 e G89 do B-loop e N101 e N103 do C-loop são essenciais para a interação com ATP (XU *et al.*, 1998). A ligação de 2OG depende de interações com a cadeia principal dos resíduos 39 e 41 e com a cadeia lateral do resíduo K58, além de um íon  $Mg^{++}$  (TRUAN *et al.*, 2010). A interação com K58 parece ser importante também para a regulação da interação de PII com algumas de suas proteínas alvo, pois esse resíduo também está envolvido em interações proteína-proteína (por exemplo, entre GlnK e AmtB de *E. coli* – CONROY *et al.*, 2007). O efeito da interação de PII com seus efetores parece ser uma mudança na conformação do T-loop; na ausência de 2OG, o resíduo K58 pode formar pontes salinas com os resíduos Q39 e E44 (TRUAN *et al.*, 2010; RADCHENKO e MERRICK, 2011). Nas proteobactérias, a ligação de ATP e 2OG é pré-condição para que ocorra modificação pós-traducional de PII. Uma mudança conformacional no T-loop causada por ligação de efetores também foi encontrada com a proteína GlnK3 da arqueia *Archaeoglobus fulgidus* (MAIER *et al.*, 2011), com o T-loop adquirindo estrutura secundária e sendo projetado lateralmente na presença de ATP e 2OG.

O T-loop é uma importante região de interação com outras proteínas; estudos estruturais mostraram que está envolvido na interação entre GlnK e AmtB de *E. coli*, PII e NAGK de *Arabidopsis thaliana*, e PipX de *Synechococcus elongatus* (RADCHENKO e MERRICK, 2011). Resíduos de aminoácidos do T-loop também são importantes para a interação entre GlnK e NifL em *Klebsiella pneumoniae* (ARCONDÉGUY *et al.*, 2000), entre GlnB e NtrC de *E. coli* (MARTÍNEZ-ARGUDO e CONTRERAS, 2002), e entre GlnB e DraT de *A. brasilense* (MOURE *et al.*, 2012). No entanto, outras regiões da proteína podem estar envolvidas em interações com outros alvos, como na interação entre GlnZ e DraG de *A. brasilense*, na qual os resíduos 21-25, 68-73, e 101-112 de GlnZ são responsáveis pela interação proteína-proteína (RAJENDRAN *et al.*, 2011).

### 1.3.3. Regulação global do metabolismo de nitrogênio pelo sistema Ntr

A regulação do metabolismo de nitrogênio em proteobactérias ocorre basicamente como uma resposta aos níveis de amônio extracelular. Em *Escherichia coli*, um dos organismos mais bem estudados nesse aspecto, há o envolvimento de nove proteínas essenciais: GlnA, GlnB, GlnD, GlnK, AmtB, NtrB, NtrC, e RpoN ( $\sigma^{54}$ ) (MERRICK e EDWARDS, 1995). O sistema funciona como uma cascata regulatória que depende da integração de sinais do ambiente celular pela proteína GlnB (HUERGO, 2006; LEIGH e DODSWORTH, 2007), que interage com outros componentes do sistema.

Tanto a uridililação quanto a remoção do grupo uridilil de GlnB são catalisadas por uma mesma enzima, GlnD, que tem sua atividade regulada por glutamina. Quando a

concentração de glutamina é baixa, a atividade de uridilil-transferase é predominante, e GlnD tende a uridililar GlnB; em condições contrárias, observa-se o efeito inverso (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). A figura 2 mostra um esquema desse processo:

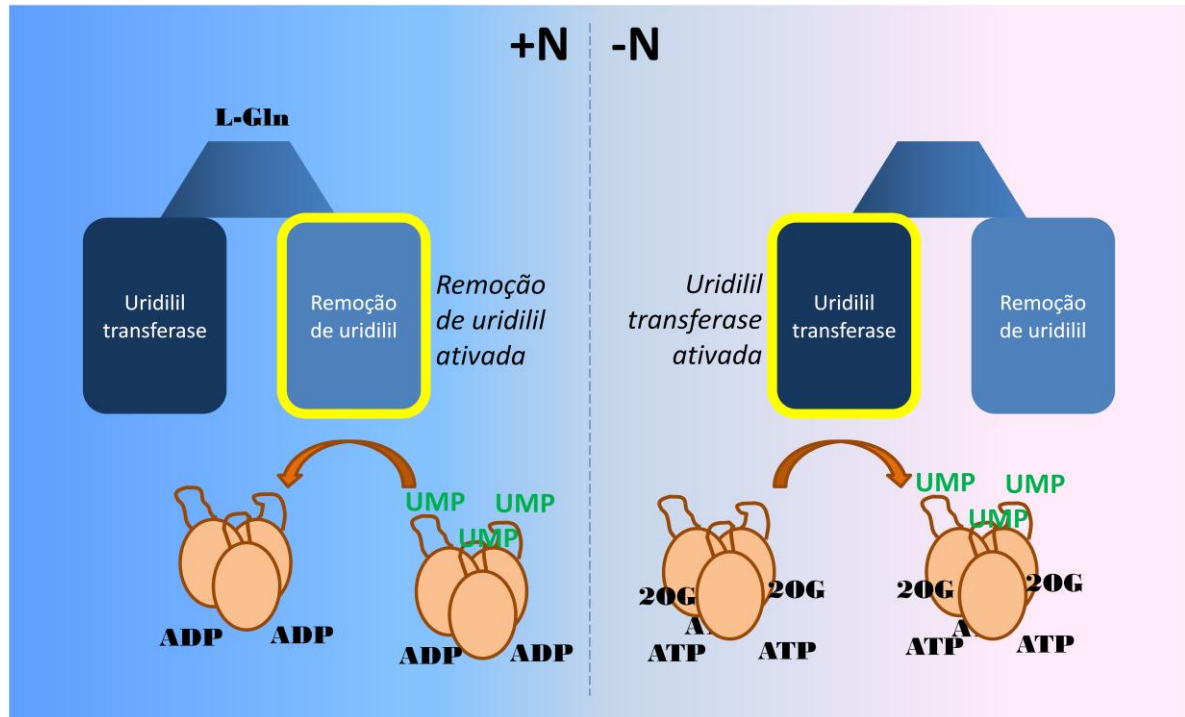


FIGURA 2 – CONTROLE DO ESTADO DE URIDILILAÇÃO DE PII POR GlnD. Quando a concentração de nitrogênio é elevada, GlnD interage com L-glutamina, o que inibe sua atividade uridilil-transferase e estimula sua atividade de remoção de UTP. Em baixas concentrações de L-glutamina, a atividade de uridilil-transferase de GlnD é estimulada, e ela tende a uridililar GlnD. A uridililação acontece quando PII está ligada a 2-oxo-glutarato e ATP. A uridililação ocorre independentemente em cada monômero de PII, e é não cooperativa em *E. coli* (ATKINSON *et al.*, 1994). Em *H. seropedicae*, a uridililação de GlnB é mais eficiente que a de GlnK, mas a desuridililação é igualmente eficiente (BONATTO, 2007).

O sensoriamento dos níveis de glutamina feito pela proteína GlnD é uma medição direta da quantidade de nitrogênio disponível para as reações metabólicas, que é comunicada às proteínas PII via modificação pós-traducional.

Além da modificação pós-traducional, a ligação das proteínas PII às moléculas efetoras é um importante regulador de sua atividade. Em *E. coli*, a alta concentração de 2-oxoglutarato inibe a interação entre GlnB e seus alvos (LEIGH e DODSWORTH, 2007).

É importante notar que a interação de PII com seus efetores (ATP, ADP e 2-oxo-glutarato) e com glutamina (indiretamente, via GlnD) resulta na integração de sinal entre os níveis intracelulares de carbono (através da ligação a 2-oxo-glutarato), energia (ligação a ATP e/ou ADP), e nitrogênio (uridililação de PII em resposta a variações na concentração intracelular de glutamina)(OLIVEIRA, 2010); assim, o metabolismo do nitrogênio será influenciado pelo metabolismo geral da célula (COMMICHAU *et al.*, 2006).

Em *E. coli*, GlnB e GlnK são proteínas que apresentam forte similaridade e alguma sobreposição de função (ATKINSON e NINFA, 1998), mas algumas funções parecem ser

restritas a apenas uma delas (LEIGH e DODSWORTH, 2007). GlnK não uridililada interage com AmtB e impede a entrada de amônio por esse transportador (COUTTS *et al.*, 2002); a resposta se manifesta poucos segundos após a ocorrência de um choque de amônio (JAVELLE *et al.*, 2004). O gene *glnK* é geralmente adjacente ao gene *amtB*, sugerindo a importância da interação entre eles, e servindo como critério de distinção entre os genes *glnB* e *glnK* (LEIGH e DODSWORTH, 2007). GlnB, expressa constitutivamente, teria um papel mais importante na regulação global do metabolismo de nitrogênio.

O estado de uridililação das proteínas PII controla a modificação da proteína GlnA pela proteína GlnE: em baixas concentrações de nitrogênio intracelular PII-UMP<sub>3</sub> interage com GlnE, estimulando a desadenililação de GlnA, o que a torna ativa; contrariamente, a interação de PII com GlnE estimula a adenililação de GlnA (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). O controle fino desse sistema parece ser exercido pela formação de heterotrímeros de GlnB e GlnK; esse heterotrímeros são formados em condições limitantes de nitrogênio (quando há expressão de GlnK), e são menos eficientes na estimulação da atividade ATase de GlnE em comparação com GlnB (HEESWIJK *et al.*, 2000).

As proteínas NtrB e NtrC, por sua vez, agem como um sistema de dois componentes que interage com a proteína GlnB. NtrB é uma proteína que possui atividade de histidinaquinase e fosfatase; essa proteína interage com GlnB não-uridililada, e essa interação leva à inibição de sua atividade quinásica e aumento da atividade fosfatásica. Quando GlnB está uridililada (em condições limitantes de nitrogênio), a interação com NtrB é inibida, e esta recupera sua atividade de fosforilação (MERRICK e EDWARDS, 1995). A interação entre GlnB e NtrB também deixa de ocorrer quando a concentração intracelular de 2-oxo-glutarato é muito elevada, de modo que NtrB terá atividade quinase mesmo se a concentração de nitrogênio não for limitante (LEIGH e DODSWORTH, 2007).

NtrC é um ativador de transcrição dependente de  $\sigma^{54}$  que só é ativo quando fosforilado no resíduo Asp-54 (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; SANDERS *et al.*, 1992). A fosforilação de NtrC é feita por NtrB, sob baixas concentrações intracelulares de nitrogênio; isso leva à oligomerização de NtrC e aquisição de atividade de ativação transcrricional (PORTER *et al.*, 1993).

Um resumo do mecanismo de regulação do metabolismo de nitrogênio de *E. coli* é representado na figura 3:

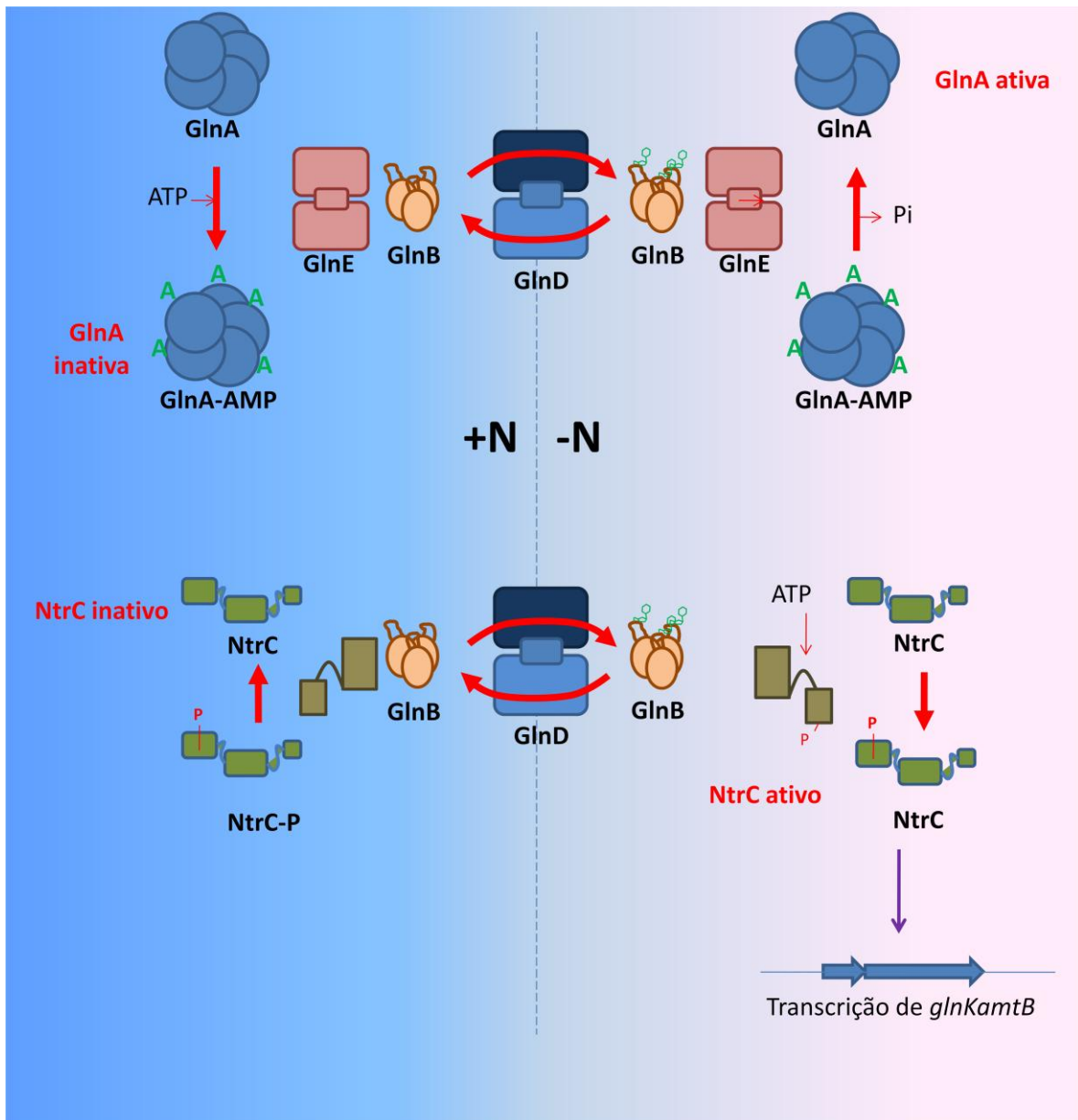


FIGURA 3 – MECANISMO GERAL DE CONTROLE DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM *E. coli*. GlnD (que se liga a glutamina) controla o estado de uridililação de PII, que controla a atividade de NtrB e GlnE. Durante a depleção de nitrogênio, GlnB (PII) uridililada interage com GlnE, que adenilila GlnA, ativando a via de síntese de glutamina. GlnB-UMP não interage com NtrB, permitindo que NtrB fosforile NtrC, que se oligomeriza e se torna ativo. NtrC ativa a transcrição de diversos genes, entre eles o operon *glnKamtB*, que codifica uma segunda proteína PII e um transportador de amônio.

Quando fosforilado, NtrC ativa a transcrição  $\sigma^{54}$ -dependente dos genes *glnAntrBC* (a partir do promotor *glnA2*), *nasFEDCBA*, *glnHPQ*, *argT*, *hisKQMP* e *NifA*, em organismos que os possuem (KUSTU *et al.*, 1989; MERRICK e EDWARDS, 1995). Esses genes são responsáveis pela assimilação de amônio, redução de nitrato e nitrito, transporte de glutamina, arginina, e histidina, e ativação transcricional dos genes *nif*, respectivamente. Outros operons ativados por NtrC, relacionados principalmente ao transporte de compostos nitrogenados, foram identificados em *E. coli*; neste organismo, aparentemente até 2% do genoma sofre algum tipo de controle por NtrC (ZIMMER *et al.*, 2000). Em alguns

organismos, como *Azospirillum brasilense*, a transcrição de *NifA* é independente de  $\sigma^{54}$  e de NtrC (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

#### 1.3.4. Regulação da FBN em *H. seropedicae*

O conjunto dos genes *nif* (responsáveis pela fixação de nitrogênio) de *H. seropedicae* inclui os genes *NifABHDKENXQWVUS*. Genes *mod*, *fdx*, *hsc*, e *fix* são encontrados dispersos entre eles. A região do genoma de *H. seropedicae* onde esses genes são encontrados contém um total de 46 orfs organizadas em ao menos sete operons (CHUBATSU *et al.*, 2011; PEDROSA *et al.*, 2001). A organização esquemática dessa região é mostrada abaixo:

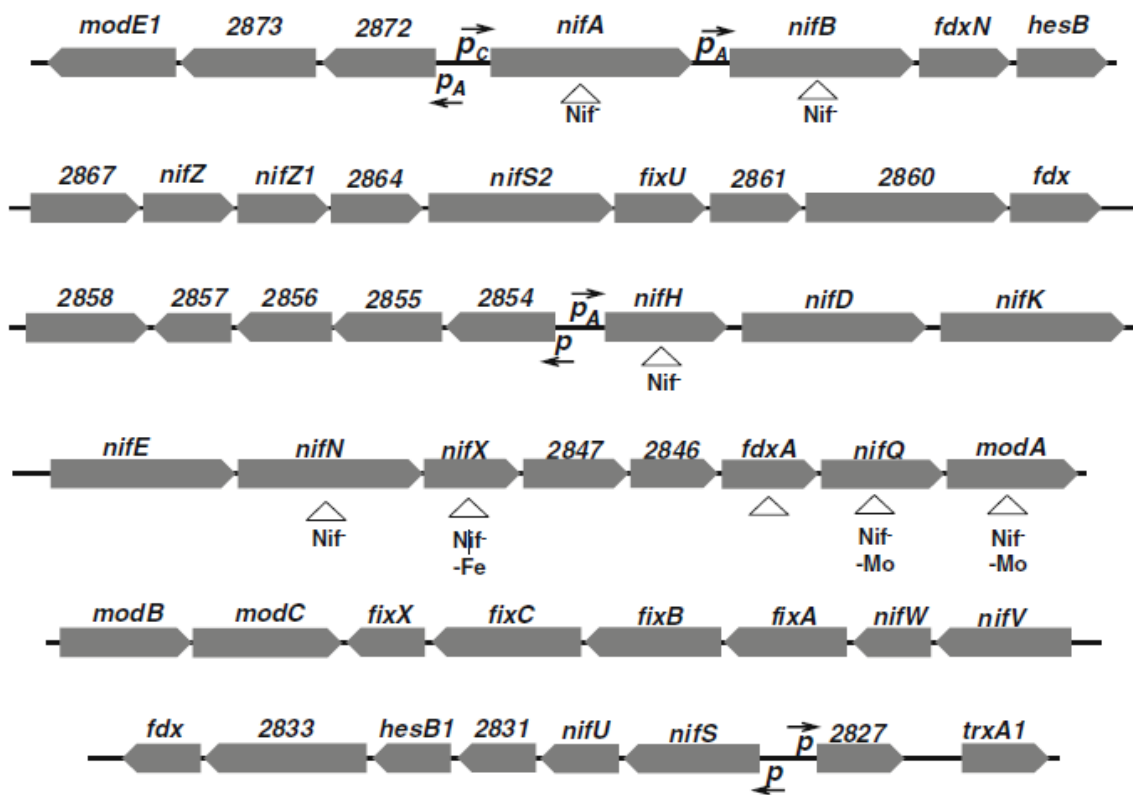


FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENES *nif* DE *H. seropedicae* E SUAS REGIÕES PROMOTORAS. Além dos genes cujos produtos são necessários para a maturação da nitrogenase, essa região contém outros genes ainda pouco caracterizados. O sinal Nif- indica genes cuja mutação leva à perda do fenótipo de fixação de nitrogênio, segundo estudos anteriores; -Fe e -Mo indicam perda da capacidade de fixar nitrogênio em condições limitantes de ferro e molibdênio, respectivamente. pc indica um promotor ativado por NtrC, e pa, um promotor ativado por NifA. Fonte: CHUBATSU *et al.*, 2011.

Os genes *nifHDKENXHsero\_2847Hsero\_2846fdxA* são transcritos em um RNA mensageiro policistrônico a partir do promotor *nifH*, e codificam as proteínas dinitrogenase redutase (Fe), as duas subunidades da dinitrogenase (FeMo), e três proteínas relacionadas à síntese e maturação do cofator de Ferro-Molibdênio da dinitrogenase, respectivamente. O promotor *nifH* foi caracterizado por Machado *et al.* (1996), e contém uma sequência -24/-12

homóloga a de promotores dependentes de  $\sigma^{54}$ , dois sítios de ligação de NifA e um sítio para ligação de IHF.

Todo o controle da transcrição dos genes *nif* em *H. seropedicae* é dependente do ativador transcricional NifA, que reconhece a seqüência do promotor *nifH*. NifA é transcrito em um RNA mensageiro monocistrônico a partir de seu próprio promotor que apresenta dois sítios de ligação para NtrC (-384 e -349), três sítios de ligação para NifA (-312, -137, e -108), um sítio de ligação a IHF, e um promotor  $\sigma^{54}$  (-24/-12) (WASSEM *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que a ativação da transcrição de *NifA* é estimulada por NtrC fosforilado (WASSEM *et al.*, 2000). A presença dos sítios de ligação para NifA indica que NifA pode ativar a transcrição a partir de seu próprio promotor, e quando inativada pode reprimir a transcrição do gene *NifA*, gerando um mecanismo de feedback negativo que possivelmente é importante na célula. IHF atua como ativador quando da ligação de NtrC ao promotor, e como inibidor quando NifA interage com o mesmo (WASSEM *et al.*, 2000). Esse complexo mecanismo de regulação subordina a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* ao controle da concentração extracelular de nitrogênio, uma vez que *NifA* será transcrita somente quando houver pouco nitrogênio disponível (condição para que NtrC esteja fosforilada); também permite que haja um *feedback* negativo de NifA sobre seu próprio promotor, impedindo que uma quantidade excessiva de NifA seja produzida, mesmo que a depleção de nitrogênio se prolongue (WASSEM *et al.*, 2000).

Pelo conhecimento atual, pode-se sugerir que o passo mais importante para o controle da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* se refere à regulação transcricional dos genes *nif*, dependente de NifA e fator  $\sigma^{54}$ , e subordinado ao controle geral de nitrogênio intracelular. Não foram encontrados genes homólogos a DraT e DraG nesse organismo, e não há caracterização de nenhum mecanismo de controle pós-traducional da nitrogenase em *H. seropedicae* (CHUBATSU *et al.*, 2011). No entanto, a atividade da nitrogenase de extratos de *H. seropedicae* decai rapidamente em resposta a choques de amônio (FU e BURRIS, 1989).

#### 1.4. PROTEÍNA NifA

A proteína NifA é ativadora transcricional dos genes *nif* nas proteobactérias diazotróficas (MERRICK e EDWARDS, 1995), e pertencente à família de ativadores transcricionais dependentes de  $\sigma^{54}$  (SHINGLER, 1996), que inclui a proteína NtrC; em *Klebsiella pneumoniae*, as duas proteínas apresentam certo grau de homologia (DRUMMOND *et al.*, 1986). Outras proteínas pertencentes à mesma família são as PspF, XylR, DctD e ZraR (OLIVEIRA, 2010).

Todas as proteínas dessa família possuem uma estrutura semelhante: elas apresentam um domínio N-terminal regulatório (a exceção sendo PspF – vide JOVANOVIC

*et al.*, 1996), um domínio central catalítico, e um domínio C-terminal de ligação a DNA. O domínio central dessas proteínas é bastante conservado e pertence à família AAA+ (ATPases associadas a diversas atividades celulares), um domínio presente em diversos polipeptídeos de procariotos e eucariotos (OGURA e WILKINSON, 2001; IYER e ARAVIND, 2004). O domínio AAA+ característico possui entre 200 e 250 resíduos de aminoácidos, entre os quais estão presentes os motivos estruturais conservados Walker A (GXXGXGK[T/S]) e Walker B (hhhhDE, sendo h qualquer resíduo hidrofóbico), responsáveis pela ligação e hidrólise do nucleotídeo trifosfato (HANSON e WHITEHEART, 2005). Proteínas que contêm domínios da família AAA+ estão envolvidos em atividades celulares tão diversas quanto replicação de DNA, ativação de transcrição, proteólise, fusão de vesículas, e transporte intracelular (OGURA e WILKINSON, 2001; HANSON e WHITEHEART, 2005).

Os ativadores de transcrição da família de NtrC possuem um motivo GAFTGA próprio não encontrado nas demais proteínas com domínio AAA+. Esses resíduos parecem estar envolvidos na interação com o fator  $\sigma^{54}$  (STUDHOLME e DIXON, 2003).

A ativação dessas proteínas parece estar relacionada com seu estado de oligomerização, que está relacionada à funcionalidade do domínio AAA+, cujos sítios de ligação a ATP são formados na interface entre os monômeros (HANSON e WHITEHEART, 2005); tipicamente, elas são diméricas quando inativas e hexaméricas ou heptaméricas quando ativas (CHEN *et al.*, 2008; ERZBERGER e BERGER, 2006).

Na maioria dos diazotrofos, a proteína NifA possui três domínios modulares (OLIVEIRA *et al.*, 2009): um domínio N-terminal de função regulatória, um domínio central catalítico (ATPásico) e capaz de interação com  $\sigma^{54}$ , e um domínio C-terminal contendo um motivo hélice-volta-hélice (HTH) de ligação ao DNA. A exceção a essa regra é a proteína NifA de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, que não possui o domínio N-terminal (IISMAA e WATSON, 1989). Os domínios central e C-terminal são relativamente conservados entre os organismos, mas o domínio N-terminal é bastante variável, refletindo a diversidade de mecanismos de regulação dessa proteína entre as diferentes espécies (FISCHER, 1994). Os domínios N-terminal e central são separados por um interdomínio rico em glutamina, o Q-linker (WOOTTON e DRUMMOND, 1989), que parece ser importante para a interação entre os domínios em outras proteínas da família de NtrC (PÉREZ-MARTÍN *et al.*, 1995).

A proteína NifA de *H. seropedicae* segue esse modelo; nesse organismo, NifA possui 542 aminoácidos, e o gene *NifA* é transcrito de um operon monocistrônico a partir de seu próprio promotor (WASSEM, 2000). Uma representação esquemática é mostrada abaixo:



FIGURA 5– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NIFA DE *H. seropedicae*. As proteínas NifA de outros diazotrofos são semelhantes, mas podem não conter alguns dos motivos representados aqui. NifA contém um domínio N-terminal com um motivo GAF, regulatório. O domínio central, catalítico, possui os motivos Walker A, Walker B, e GAFTGA, comuns a todos os ativadores transcricionais da família AAA+. Entre esses dois domínios, está localizado o Q-linker, um interdomínio rico em resíduos de glutamina. O domínio central conecta-se ao domínio C-terminal (que tem um motivo HTH de ligação ao DNA) através do interdomínio ID. No final do domínio central e início do linker ID, há um motivo conservado de quatro cisteínas, com provável envolvimento na inativação de NifA por O<sub>2</sub>.

Os domínios Central (AAA+) e C-terminal (HTH) de NifA são homólogos aos encontrados em outras proteínas, e sua função já foi discutida acima. O domínio N-terminal, por sua vez, apresenta um motivo GAF, encontrado em bactérias e eucariotos (ARAVIND e PONTING, 1997). O domínio GAF parece ser importante para a ligação a cGMP e outros pequenos ligantes em outras proteínas (HO *et al.*, 2000; HURLEY, 2003), e sugere-se que sua função seja de transdução de sinal (ARAVIND e PONTING, 1997). O domínio N-terminal (GAF) e o domínio central (AAA+) de NifA de *H. seropedicae* são conectados por um interdomínio Q (Q-linker), uma seqüência de 18 resíduos de aminoácidos rica em resíduos de glutamina. Proteínas AAA+ que possuem um domínio GAF N-terminal regulatório freqüentemente são inibidas por este, e recentemente um modelo foi proposto para explicar essa inibição (BATCHELOR *et al.*, 2013). O modelo propõe que a interação de dois domínios GAF entre si e com seus respectivos domínios centrais mantém a proteína na forma dimérica inativa; uma mudança na conformação do domínio GAF interrompe sua interação com o domínio central, permitindo oligomerização e atividade ATPásica, conforme mostrado na figura abaixo:

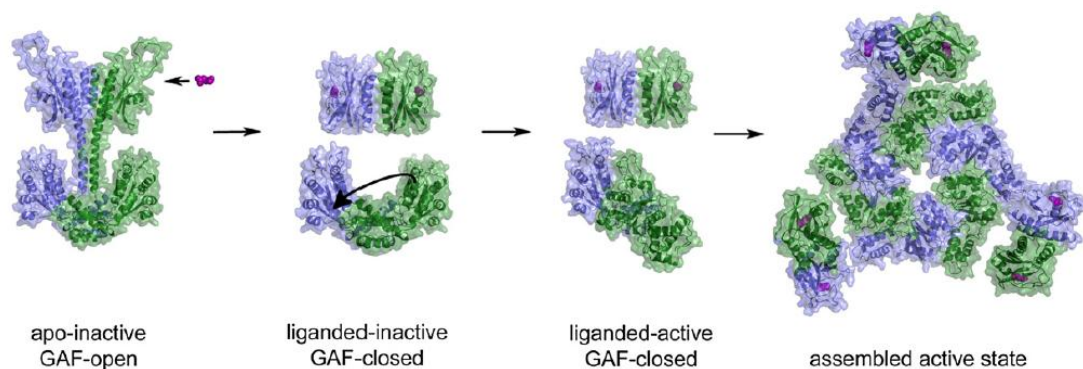


FIGURA 6 – MODELO PROPOSTO PARA A ATIVAÇÃO DE PROTEÍNAS AAA+ QUE POSSUEM DOMÍNIO GAF N-TERMINAL. O domínio GAF mantém a proteína em sua forma dimérica através de interações entre os domínios GAF, possivelmente entre o domínio GAF e o domínio catalítico. Uma modificação na conformação de GAF (na figura, devido à interação com um ligante) permite a associação entre os domínios catalíticos, com subsequente oligomerização da proteína. Fonte: BATCHELOR *et al.*, 2013.

A atividade de NifA é controlada pelos níveis extracelulares de amônio e oxigênio na maioria dos diazotrofos (DIXON e KAHN, 2004), mas o mecanismo de regulação é muito variado. Basicamente, as proteínas NifA de proteobactérias podem ser divididas em dois grupos: o primeiro compreende as  $\gamma$ -proteobactérias e *Azoarcus*, nas quais que a regulação de NifA se deve à interação com a proteína sensora NifL, formando ambas um sistema de dois componentes como em *Klebsiella pneumoniae* (BERGER *et al.*, 1994); e as  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactérias (exceto *Azoarcus*), em que não há presença de NifL, e a regulação de NifA ocorre de outra forma (OLIVEIRA, 2010).

Em diversos organismos, ocorre também regulação da transcrição do gene *NifA*. Em *H. seropedicae*, a transcrição de *NifA* é dependente de NtrC, estando diretamente subordinada ao controle geral do metabolismo de nitrogênio (WASSEM *et al.*, 2000). Em *A. brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, por outro lado, a transcrição de *NifA* é constitutiva (ZOU *et al.*, 2008).

Nas  $\gamma$ -proteobactérias, *NifA* é co-transcrito com o gene *nifL*, que codifica a proteína sensora NifL, que interage diretamente com NifA de forma inibitória quando as condições celulares não são adequadas para a fixação de nitrogênio (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). A proteína NifL de diversos organismos é sensível a oxigênio, e interage com NifA quando seu cofator FAD está oxidado (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). NifL também é necessária para a inativação de NifA em resposta a alta concentração de nitrogênio intracelular. No entanto, o mecanismo de interação entre NifL e GlnK não parece ser conservado: em *K. pneumoniae*, a interação entre NifA e GlnK leva à ativação de NifA, independentemente do estado de uridililação de GlnK (HE *et al.*, 1998); NifA também parece interagir com GlnK em um sítio próximo ao de sua interação com NifL (GLÖER *et al.*, 2008). Em *Azotobacter vinelandii*, por outro lado, a interação entre GlnK e NifL inativa NifA, e essa inibição é aliviada pela uridililação de GlnK, que impede sua interação com NifL (RUDNICK *et al.*, 2002). Logo, embora GlnK claramente desempenhe um papel na regulação de NifA, o mecanismo observado em um organismo não pode ser extrapolado para os demais.

Nas  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactérias, por outro lado, não há proteína NifL, e por isso NifA é regulada por outros mecanismos; a exceção a essa regra é *Azoarcus* sp., que possui um gene *nifL* (EGENER *et al.*, 2002). Em diversos organismos, a inibição de NifA na presença de oxigênio é atribuída a um motivo de cisteínas presente no domínio Central e no interdomínio Q, que supostamente poderia coordenar íons de ferro (OLIVEIRA, 2010). Nesse caso, a mudança no estado de oxidação dos átomos de ferro seria responsável por mudanças na conformação de NifA que determinariam sua atividade. Em *H. seropedicae*, foi mostrado que a substituição de quaisquer desses resíduos de cisteína implica em completa perda de atividade da proteína NifA (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A regulação de NifA em  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactéria pela concentração intracelular de nitrogênio parece envolver interação entre o domínio N-terminal de NifA e proteínas do tipo PII (ARSÈNE *et al.*, 1996; LEIGH e DODSWORTH, 2007; NOINDORF *et al.*, 2011; PASCHEN *et al.*, 2001; ZOU *et al.*, 2008).

Em *A. brasilense*, a interação direta entre o domínio N-terminal de NifA e GlnB foi detectada por experimentos de duplo híbrido (CHEN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005) e pull-down (SOTOMAIOR *et al.*, 2012), e foi demonstrada ser dependente de ATP e 2OG (SOTOMAIOR *et al.*, 2012). Nesse organismo, o domínio N-terminal de NifA é responsável pela regulação por amônio (ARSÈNE *et al.*, 1996). A mutação dos resíduos Y18 e Y53 do domínio N-terminal leva à perda da interação com GlnB, mas não a perda de regulação por amônio (ARSÈNE *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2005), assim como a mutação do resíduo Y43 (CHEN *et al.*, 2005). Zhou e colaboradores (2008), por outro lado, sugeriram que as regiões entre os resíduos 66 e 88 e entre 165 e 176 da proteína estão envolvidos na interação com PII.

Em *Rhodobacter capsulatus*, que possui duas cópias funcionais do gene *NifA* (MASEPOHL *et al.*, 1988), a atividade de NifA sofre influência de GlnB e GlnK (PAWLOWSKI *et al.*, 2003); duplos mutantes *glnB/glnK* não tem regulação de NifA por amônio (DREPPER, 2003). Nesse organismo, NifA aparentemente é regulada por interação entre seus domínios N-terminal e C-terminal; mutações pontuais aleatórias introduzidas nesses domínios (V42E, L66Q, I460F, E477Q, K531T) induzem a perda de regulação por amônio, sugerindo uma possível interação entre os dois domínios (PASCHEN *et al.*, 2001).

Em *R. rubrum*, NifA parece ser ativada pela interação com GlnB-UMP. Mutações no resíduo de aminoácido M173 e outros resíduos N-terminais geram variantes de NifA ativas mesmo na ausência de GlnB (ZOU *et al.*, 2008). Como em *A. brasilense*, o domínio N-terminal de NifA interage diretamente com GlnB (ZHANG *et al.*, 2004; ZOU *et al.*, 2008). Estudos com mutagênese aleatória do gene *glnB* com seleção de proteínas não-uridililadas capazes de interagir com NifA revelou que a mutação de resíduos em várias regiões de GlnB, não só no T-loop, pôde gerar proteínas capazes de ativar NifA sem uridililação (ZHU *et al.*, 2006).

Na proteína NifA de *H. seropedicae*, a regulação da atividade catalítica por amônio também é atribuída ao domínio N-terminal. A construção de um mutante N-truncado produziu uma variante de NifA ativa e não regulada por amônio (MONTEIRO *et al.*, 1999); posteriormente, foi demonstrado que essa variante N-truncada sofre regulação *in trans* pelo domínio N-terminal co-expresso a partir de outro plasmídeo em *E. coli*. (MONTEIRO *et al.*, 1999b), o que está de acordo com o modelo de regulação proposto para outras proteínas NifA e para outros ativadores de transcrição da mesma família (FIEDLER e WEISS, 1995; PÉREZ-MARTÍN *et al.*, 1995; ZOU *et al.*, 2008).

A perda da inibição de NifA de *H. seropedicae* em concentrações limitantes de nitrogênio é atribuída à interação entre o domínio GAF e a proteína GlnK em *H. seropedicae*, uma vez que o mutante *glnK* é incapaz de fixar nitrogênio (NOINDORF, 2006). O aumento da expressão de GlnB pode substituir parcialmente a ausência de GlnK nesse organismo (NOINDORF *et al.*, 2011). As diferenças de expressão entre PII podem estar relacionadas com a falta de atividade da NifA selvagem de *H. seropedicae* em *E. coli*, explicando porque PII de *E. coli* não é capaz de ativar NifA de *H. seropedicae*; alternativamente, PII de *E. coli* podem ser incapazes de interagir especificamente com NifA. Um esquema do modelo de regulação atualmente aceito é mostrado na figura 7:

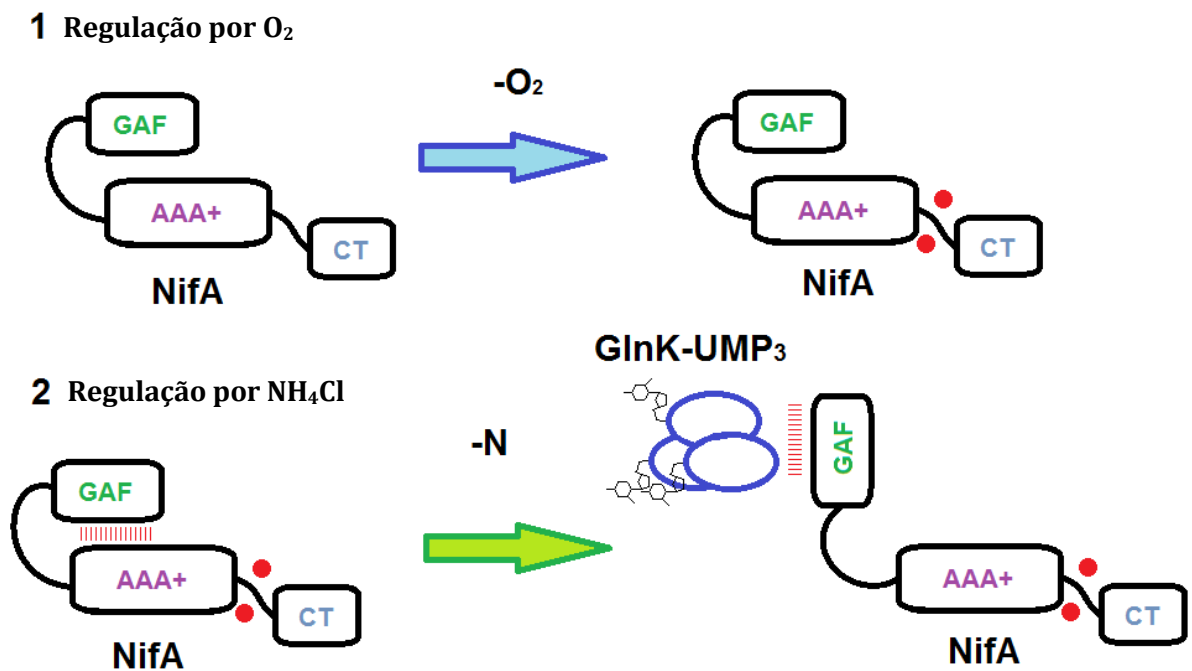


FIGURA 7 – REGULAÇÃO DE NIF A DE *H. seropedicae*. (1) Na ausência de oxigênio, forma-se um cluster de Fe-S essencial para a atividade de NifA. (2) Em baixa concentração de nitrogênio, GlnK-UMP<sub>3</sub> interage com o domínio n-terminal de NifA, impedindo a inibição deste sobre o domínio central.

## 1.5. JUSTIFICATIVA

A ativação de NifA por PII em *H. seropedicae* já foi mostrada em experimentos in vivo (NOINDORF *et al.*, 2011), e a interação direta entre as duas proteínas foi sugerida por ensaios in vitro (OLIVEIRA *et al.*, 2012); a base molecular dessa interação, porém, ainda não foi elucidada. O papel da uridililação de PII e de sua ligação a efetores (ATP, ADP, 2OG) na interação/ativação de NifA ainda não foi descrito em *H. seropedicae*, e os resíduos de aminoácidos críticos para esses dois processos ainda não foram caracterizados. Este trabalho se insere na tentativa de elucidar algumas das questões mencionadas acima.

## 2. OBJETIVOS

Determinar resíduos de aminoácidos ou regiões de NifA e de proteínas PII importantes para a ativação de NifA por PII.

Para realizar o objetivo geral, tem-se por objetivos específicos:

- 2.1. Determinar a capacidade de ativar NifA de diferentes proteínas PII em um modelo de expressão em *E. coli*.
- 2.2. Encontrar resíduos de aminoácidos candidatos em GlnK para a mutagênese sítio-dirigida por meio de análise de seqüências; gerar mutantes pontuais e avaliar sua capacidade de ativar NifA.
- 2.3. Construir genes expressando GlnK mutantes nos resíduos de aminoácidos Y51 (sítio de uridililação), K58 (importante para a interação com 2OG) e G89 (importante para a interação com ATP e ADP), e avaliar sua capacidade de ativar NifA.
- 2.4. Construir mutantes aleatórios de *glnK*, e avaliar a capacidade de seus produtos de ativar NifA.
- 2.5. Purificar os domínios N-terminal e Central+C-terminal de NifA e a proteína GlnK de *H. seropedicae* para ensaios de interação in vitro.
- 2.6. Verificar a ocorrência de interação in vitro entre as proteínas NifA e GlnK na presença de ATP, ADP, e 2OG.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES

Produtos químicos foram adquiridos das companhias Sigma-Aldrich, Merck e JT Baker, exceto quando o fabricante for expressamente citado. Ágar, agarose, dNTPs, IPTG, ONPG e Xgal foram adquiridos da empresas Invitrogen e Fermentas. As enzimas de restrição e seus respectivos tampões foram comprados da empresa Fermentas. Enzimas modificadoras de DNA foram obtidas da Invitrogen ou USB. Taq DNA polimerase foi purificada no próprio laboratório (MASOTaq – Marco Aurélio Schuller de Oliveira, não publicado). Gases para ensaios com troca gasosa foram comprados da empresa White-Martins. A água ultrapura foi produzida no laboratório com um equipamento Millipore MilliQ® Synthesis, e autoclavada antes do uso.

#### 3.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Bactéria	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Sm <sup>R</sup> ; F' [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacZ</i> ΔM15]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
JM109 (λDE3)	F' <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacIq</i> Δ( <i>lacZ</i> )M15/ Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>glnV44 e14</i> – <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
BL21 (λDE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
Plasmídeos	Genótipo/fenótipo	Referência/Fonte
pTZ57R	Ap <sup>R</sup> , vetor contendo um sítio de policlonagem inserido no gene α- <i>lacZ</i> .	Fermentas
pT7-7	Ap <sup>R</sup> , vetor para expressão a partir do promotor T7	TABOR e RICHARDSON, 1985
pET29a	Km <sup>R</sup> , vetor para expressão a partir do promotor T7. Capaz de expressar proteínas com fusão His-tag C-terminal	Novagen
pETDuet1	Ap <sup>R</sup> , vetor para expressão de dois genes, cada um a partir de seu próprio promotor T7.	Novagen

pRT22	Cm <sup>R</sup> , <i>nifH</i> ( <i>K. pneumoniae</i> ):: <i>lacZ</i> . Originado do plasmídeo pWVC22	TULI; MERRICK, M. J., 1988
pRAM1	Km <sup>R</sup> , contém o gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado BamHI/BamHI em pET28a	MONTEIRO, 2001
pRAM1T7	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/BamHI em pT7-7	STEFANELLO, 2011
pETN45	Km <sup>R</sup> , contém a variante N45 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pETN90	Km <sup>R</sup> , contém a variante N90 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pETN135	Km <sup>R</sup> , contém a variante N135 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pETN165	Km <sup>R</sup> , contém a variante N165 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pETN185	Km <sup>R</sup> , contém a variante N185 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pETN218	Km <sup>R</sup> , contém a variante N218 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pETN244	Km <sup>R</sup> , contém a variante N244 de <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	STEFANELLO, 2011
pLH25	Km <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>Azospirillum brasilense</i> clonado XbaI/BamHI em pET28a	HUERGO <i>et al.</i> , 2005
pGlnB_42-54	Km <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnB com deleção dos resíduos 42-54 clonado em pET28a	MOURE <i>et al.</i> , 2013
pMSA4	Km <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> clonado XbaI/BamHI em pET28a	MOURE <i>et al.</i> , 2011
AbdeltaTZ	Km <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnZ com deleção dos resíduos 42-54 clonado em	Luciano Fernandes Huergo, não publicado

	pET28a	
pMSGInBZ1	Km <sup>R</sup> , contém um gene que codifica uma proteína quimérica de GlnB (resíduos 1-91) e GlnZ (92-112) de <i>A. brasilense</i> .	RAJENDRAN <i>et al.</i> , 2011
pMSGInZB1	Km <sup>R</sup> , contém um gene que codifica uma proteína quimérica de GlnZ (resíduos 1-48) e GlnB (49-112) de <i>A. brasilense</i>	RAJENDRAN <i>et al.</i> , 2011
pTRPETglnB	Km <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>E. coli</i> clonado em pET29a	RODRIGUES, 2013
pETHsglnB	Km <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/BamHI em pET29a	Marco A. S. Oliveira, não publicado
pEMB200	Km <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/BamHI em pET29a	BONATTO <i>et al.</i> , 2007
pETG185his	Km <sup>R</sup> , contém um gene que codifica os resíduos 1-185 de NifA de <i>H. seropedicae</i> fusionado a uma cauda de histidinas C-terminal, em pET28a.	Adriano A. Stefanello, não publicado
pAASHdeltaTglnKTZ	Ap <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado em pTZ57R	Este trabalho
pAASHdeltaTglnK29	Km <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado em pET29a	Este trabalho
pAASNifAKTZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> amplificado com o primer hsNifAKpn clonado em pTZ57R.	Este trabalho
DNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/KpnI no MCSII de pETDuet1.	Este trabalho
pAASHglnKkTZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> amplificado com o primer pET28aKpn rev2 clonado em pTZ57R.	Este trabalho
DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/KpnI no MCSII de pETDuet1.	Este trabalho
pAASN185kTZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica para a variante N185 de NifA de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho

	amplificado com o primer pET28aKpn rev2 clonado em pTZ57R.	
DN185	Ap <sup>R</sup> , contém o gene para a variante N185 de NifA de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/KpnI no MCSII de pETDuet1.	Este trabalho
HsglnBDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsdeltaTglnKDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
EcglnBDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>E. coli</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
AbglnBDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
AbglnZDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
AbdeltaTglnBDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnB com deleção dos resíduos 42-54 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA	Este trabalho
AbdeltaTglnZDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnZ com deleção dos resíduos 42-54 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA	Este trabalho
AbB91ZDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o inserto de pMSGlnBZ1 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
AbZ48BDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o inserto de pMSGlnZB1 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKDN185	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DN185.	Este trabalho
AbglnBDN185	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DN185.	Este trabalho
AbglnZDN185	Ap <sup>R</sup> , contém o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DN185.	Este trabalho
AbdeltaTglnBDN185	Ap <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnB</i> de <i>A.</i>	Este trabalho

	<i>brasile</i> que expressa GlnB com deleção dos resíduos 42-54 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DN185	
AbdeltaTglnZDN185	Ap <sup>R</sup> , contém uma variante gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasile</i> que expressa GlnZ com deleção dos resíduos 42-54 clonado XbaI/BamHI no MCSI de DN185	Este trabalho
pAASHsglnKY51FTZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Y51F clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKV52STZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição V52S clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKD54STZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição D54S clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKG89ATZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G89A clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKQ94LTZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Q94L clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKG108NTZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G108N clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKD110ATZ	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição D110A clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKY51F29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Y51F clonado NdeI/BamHI em pET29a.	Este trabalho
pAASHsglnKV52S29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição V52S clonado NdeI/BamHI em pET29a.	Este trabalho
pAASHsglnKD54S29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição D54S clonado NdeI/BamHI em pET29a.	Este trabalho
pAASHsglnKG89A29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G89A clonado NdeI/BamHI em pET29a.	Este trabalho
pAASHsglnKQ94L29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de	Este trabalho

	<i>H. seropedicae</i> com substituição Q94L clonado NdeI/BamHI em pET29a.	
pAASHsglnKG108N29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G108N clonado NdeI/BamHI em pET29a.	Este trabalho
pAASHsglnKD110A29	Km <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição D110A clonado NdeI/BamHI em pET29a.	Este trabalho
HsglnKY51FDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Y51F clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKV52SDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição V52S clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKD54SDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição D54S clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKG89ADNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G89A clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKQ94LDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Q94L clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKG108NDNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G108N clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
HsglnKD110ADNifA	Ap <sup>R</sup> , contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição D110A clonado XbaI/BamHI no MCSI de DNifA.	Este trabalho
hisN45DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N45 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho
hisN90DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N90 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho
hisN135DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N135 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho
hisN165DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N165 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho

hisN185DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N185 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho
hisN218DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N218 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho
hisN244DHsglnK	Ap <sup>R</sup> , contém a variante N244 do gene <i>NifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/BamHI no MCSI de DHsglnK	Este trabalho

### 3.3. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

*E. coli* foi cultivada em meio líquido Luria-Bertani (LB – (SAMBROOK *et al.*, 1989)) e em meio sólido Luria-Bertani-ágar (LA). O meio SOB (WARREN, 2011) foi usado para cultivo de células quimiocompetentes e eletrocompetentes, e o meio SOC (SOB + 2% glucose) foi usado para a recuperação dessas células após a transformação. Para os ensaios de  $\beta$ -galactosidase em *E. coli*, foi empregado o meio mínimo NFDM (CANNON *et al.*, 1974) suplementado com 0,02% de casamino ácidos. A esse meio, dependendo das condições do ensaio, foram adicionados 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl. A tabela 2 contém a composição dos meios de cultura supracitados:

TABELA 2 – MEIOS DE CULTIVO PARA *E. coli*

LB

Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	10 g/L
NaCl	10 g/L

SOB (pH ajustado para 7,0 com KOH)

Caseína hidrolisada	20g/L
Extrato de levedura	5g/L
NaCl	10mmol/L
KCl	2,5mmol/L

## NFDM

$K_2HPO_4$	12,06g/L
$KH_2PO_4$	3,4g/L
$MgSO_4$	0,1 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,025 g/L
D-glucose	20 g/L

## 3.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram pesados e dissolvidos para soluções-estoque no solvente mais apropriado. Antibióticos dissolvidos em água foram filtrados através de um filtro de 0,22  $\mu$ m (Millipore). As soluções de antibiótico foram adicionadas aos meios de cultivo nas concentrações especificadas na tabela abaixo:

TABELA 3 - ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Solvente	Concentração ( $\mu$ g/mL)
Estreptomicina	Água	20
Ampicilina	Água	250
Canamicina	Água	100
Cloranfenicol	Etanol	30

3.5. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* QUIMIOCOMPETENTE

O preparo de *E. coli* quimiocompetente seguiu o protocolo de Inoue, Nojima e Okayama (1990), com poucas modificações. Um mililitro de uma cultura de *E. coli* em fase estacionária foi inoculado em 100 mL de meio SOB. A cultura foi incubada em um erlenmeyer de 1L a 180 rpm e 25°C até atingir  $DO_{600nm} = 0,6$  ( $l=1cm$ ). Após isso, a cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos, centrifugada a 2500 g a 4°C por 10 minutos, e gentilmente ressuspendida em 40 mL de solução de transformação (10 mM HEPES, 55 mM

MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7). A suspensão de células foi mantida em banho de gelo por 10 minutos, e então centrifugado conforme já descrito. O pellet de células foi ressuspenso em 10 mL de solução de transformação contendo 7% DMSO. A suspensão celular foi dividida em alíquotas de 1 mL e congelada em nitrogênio líquido para uso posterior.

Para a transformação bacteriana, 0,2 – 0,5 µL de plasmídeo purificado ou até 3 µL de sistema de ligação de DNA foram adicionados a 100 µL de célula quimiocompetente, e incubados no gelo por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se com um choque térmico de 42°C por 30 segundos, seguido de incubação no gelo por 2 minutos. Adicionou-se então 400 µL de meio SOC a cada alíquota de células, e incubou-se as alíquotas por 60 minutos a 37°C. Após isso, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados.

### 3.6. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* ELETROCOMPETENTE

Um mililitro de cultura de *E. coli* em fase estacionária foi inoculado em 100 mL de meio LB, e incubado sob agitação a 37°C até DO<sub>600nm</sub> entre 0.5 e 0.8 (l=1cm). A cultura foi então resfriada no gelo por 30 minutos, centrifugada a 5000 g por 5 minutos, e o precipitado foi lavado duas vezes com 50 mL de água MilliQ estéril e uma vez com 50 mL de glicerol 10%. Ao final da última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em ~400 µL de glicerol 10%, e foram confeccionadas alíquotas de 100 µL cada, que foram estocadas a -70°C.

A transformação foi feita mediante adição de 0,5-1 µL de ligação/plasmídeo íntegro a 100 µL de célula competente, transferência do mix para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad, cubeta de 0,2 cm – cat. no.165-2086), e aplicação de uma diferença de potencial de 1,8 – 2,5 kV com o aparelho Gene Pulser II ® (Bio-Rad). Após o choque, adicionou-se 0,9 mL de meio LB à cubeta, e incubou-se a suspensão a 37°C por 60 minutos. Após isso, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados.

### 3.7. ANÁLISE *IN SILICO*

#### 3.7.1. Edição e análise de seqüências

As seqüências de DNA (extensão .ab1 ou .fas) foram analisadas nos programas BioEdit (Ibis Biosciences) e MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011); os alinhamentos de seqüências foram feitos preferencialmente neste último, utilizando o algoritmo ClustalW (CHENNA *et al.*, 2003).

## 3.7.2. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os primers foram desenhados com o auxílio da ferramenta OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>), da companhia IDT. Sítios de restrição foram introduzidos nas seqüências de cada primer para facilitar os procedimentos de clonagem. Os primers projetados estão listados abaixo; a temperatura de fusão foi calculada com a ferramenta OligoAnalyzer (IDT).

TABELA 4 – PRIMERS DESENHADOS E SINTETIZADOS PARA USO NESTE TRABALHO

Primer	Seqüência	T <sub>m</sub> (°C)
pET28aKpn rev2	GTCGACGGAGCTTGGATCCGGTACC	64,5
hsNifA2AKpn	TTTGGTACCTCAGAACTTCTTGAC	54,7
NifAXhol fwd	CCAGCTCTCGAGGCAACTCCAG	61,8
NifAXhol rev	CTGGAGTTGCCTCGAGAGCTGG	61,8
T7F grd	CCC GCGAAATTAATACGACTCACTAT	59,8
T7term grd	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	57,8
GlnKY51R	CGACCACGAATTCCGCGCCGC	71,7
GlnKY51F	GCGGCGCGGAATTCGTGGTCG	71,7
hsglnKdeltaTloop f	TCGTCAGAAGGGCTTCCTGCCCAAGACCA	67,7
hsglnKdeltaTloop r	TGGTCTTGGGCAGGAAGCCCTTCTGACGA	67,7
hsGlnB f	AGCCATATGAAACAAGTGACC	52,9
hsGlnB r	ATAGGATCCTCAGACGGCAT	55,2
hsGlnK V52S f	CGGAATACTCGGTCGATTTTC	53,0
hsGlnK V52S r	GAAATCGACCGAGTATTCCG	53,0
hsGlnK D54S f	TACGTGGTCTCTTTCTG	51,0
hsGlnK D54S r	CAGGAAAGAGACCACGTA	51,0
hsGlnK T79K f	ATCGAGAAAGCTGCCC	52,0
hsGlnK T79K r	GGGCAGCTTTCTCGAT	52,0
hsGlnK Q94L f	TTCGTCCTGGACCTGCT	56,0

hsGlnK Q94L r	AGCAGGTCCAGGACGAA	56,0
hsGlnK D98Q f	CTGCTGCAGGTGATCC	53,1
hsGlnK D98Q r	GGATCACCTGCAGCAG	53,1
hsGlnK G108N f	GAGACCAACAAAGACGCT	52,5
hsGlnK G108N r	AGCGTCTTTGTTGGTCTC	52,5
hsGlnK D110A f	GCAAAGCCGCTCTGTAA	53,0
hsGlnK D110A r	TTACAGAGCGGCTTTGC	53,0
hsGlnK G89A f	GCGACGCCAAGATCT	52,1
hsGlnK G89A r	AGATCTTGGCGTCGC	52,1
DuetUP2	TTGTACACGGCCGCATAATC	55,5
DuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA	55,5
G185	GCACGGATCCTCTTGCA	56,2

Outros primers utilizados foram elaborados em trabalhos anteriores; estão relacionados abaixo, com os sítios de restrição sublinhados:

TABELA 5 – PRIMERS DESENHADOS EM TRABALHOS ANTERIORES

Primer	Seqüência	Tm (°C)
HSNIFA2A	AGAGGATCCTCAGAACTTCTT	
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG	47,5
T7 terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG	46,3
Universal	GACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	59,9
Reverso	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC	55,4
N165 RAM	ATGGTGGCCCATATGATCGGA	

### 3.7.3. Visualização de estruturas de proteínas

Os arquivos com extensão .pdb foram visualizados com o programa PyMol (DeLano Scientific).

### 3.8. MANIPULAÇÃO DO DNA

#### 3.8.1. Amplificação do DNA

A amplificação de DNA foi feita em sistemas de 10  $\mu\text{L}$  contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P-40, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 2 ng/ $\mu\text{L}$  de cada primer, 10-100 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA molde, e 4% v/v de MASOTaq (Taq DNA polimerase purificada e ccedida pelo Dr. Marco Aurélio Schuller de Oliveira). Um sistema de reação típico, usando reativos da empresa Fermentas, é mostrado abaixo:

TABELA 6 – SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA

Reagente	Quantidade ( $\mu\text{L}$ )
Tampão KCl 10x (Fermentas)	1
$\text{MgCl}_2$ 25 mM (Fermentas)	0,8
dNTP mix 5 mM	0,4
Primer 1 100 ng/ $\mu\text{L}$	0,2
Primer 2 100 ng/ $\mu\text{L}$	0,2
DNA molde	0,2
MASOTaq	0,4
Água ultrapure	7

O programa de amplificação do DNA sempre incluiu 95°C 5 min, 20 a 25 ciclos de [95°C 30 s, 50-60°C 30 s, 72°C 1 min/kb], e 72°C 20 min. A temperatura de anelamento foi usualmente 50°C, mas para o uso de primers com  $T_m$  muito acima de 50°C foi necessário usar temperaturas mais altas.

#### 3.8.2. Amplificação mutagênica do DNA

Para a amplificação mutagênica de DNA, visando à construção de bibliotecas de mutantes aleatórios, foram feitos sistemas de 50  $\mu\text{L}$  contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P-40, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 2 ng/ $\mu\text{L}$  de cada primer, <100 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA molde, e 4% v/v de MASOTaq.

O programa de amplificação do DNA utilizado foi 95°C 5 min, 25 ciclos de [95°C 30 s, 50-60°C 30 s, 72°C 2 min], e 72°C 20 min.

### 3.8.3. Mutagênese sítio-dirigida

A geração de mutantes pontuais no gene *glnK* de *H. seropedicae* foi feita de acordo com a estratégia de mutagênese dirigida por oligonucleotídeos (HO *et al.*, 1989), no qual se utilizam primers complementares a uma região do gene contendo um (ou mais) erros de pareamento, que introduzem mutações no gene. O gene a ser mutagenisado foi amplificado inicialmente com dois conjuntos de primers separados: um primer complementar à região 5' com um primer mutagênico 3', e um primer mutagênico 5' (complementar ao primer mutagênico 5') com um primer 3'. Os dois produtos de PCR gerados são misturados e usados como molde para uma nova reação de amplificação usando os primers 5' e 3' não-mutagênicos. O produto dessa segunda PCR contém a mutação desejada. Uma representação desse processo é mostrada na figura abaixo:

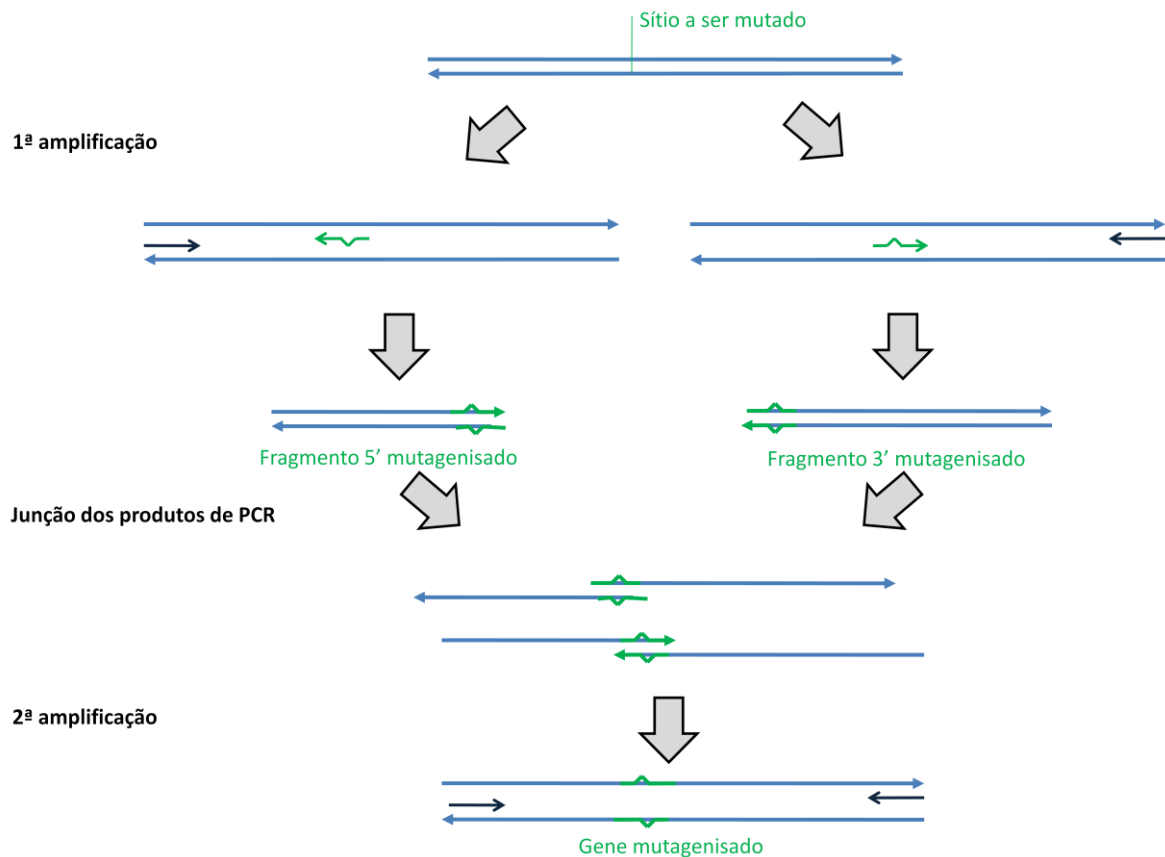


FIGURA 8 – ESQUEMA DE MUTAGÊNESE DIRIGIDA POR OLIGONUCLEOTÍDEOS. A técnica consiste de duas etapas de PCR. Na primeira etapa, dois fragmentos do gene são amplificados separadamente, usando primers mutagênicos que introduzem a mudança desejada em ambos os fragmentos. Na segunda etapa, os fragmentos são misturados e amplificados com os primers 5' e 3', para produção de um gene inteiro contendo a mutação desejada.

Para a geração de mutantes do gene *glnK*, o DNA molde inicial foi o plasmídeo pEMB200, e os primers não mutagênicos foram T7F *grd* e T7term *grd*. Os primers mutagênicos estão listados na tabela 4.

### 3.8.4. Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento dos plasmídeos foi feito pelo método de Sanger *et al.* (1977), usando dideoxiribonucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluorescência. A reação de seqüenciamento foi feita com o reativo BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies), e incubada em um termociclador Eppendorf MasterCycler. Os reagentes presentes em cada sistema estão discriminados na tabela 7.

TABELA 7 – SISTEMA DE REAÇÃO PARA SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Reagente	Quantidade (µL)
Sequencing buffer 5x	2
Sequencing mix RR-100	1
Primer	0,5
DNA plasmidial	0,5
Água ultrapura	6

O programa utilizado para a reação de seqüenciamento foi 96°C 1 min, 40 ciclos de [96°C 15 s, 50°C 15 s, 60°C 4 min], 60°C 1 min.

Os produtos de cada reação foram precipitados com acetato de amônio e etanol, lavados com etanol 70%, secados, ressuspensos em tampão de corrida (Life Technologies) e analisados em um seqüenciador ABI3500 (Applied Biosystems).

### 3.8.5. Digestão com endonucleases de restrição

As digestões de DNA para clonagem gênica foram feitas em sistemas de 10 µL contendo 2 a 5 unidades de enzima, durante 4 h ou 24 h a 37°C. Após a incubação, os sistemas foram aquecidos por 20 minutos para inativar as enzimas termossensíveis. Quando se trabalhou com enzimas resistentes ao calor, foi feita extração com clorofórmio e precipitação. O tampão usado em cada digestão foi escolhido conforme a recomendação do fabricante (Fermentas).

Digestões de DNA executadas apenas para confirmação de padrões de restrição foram feitas em sistemas de 5 µL contendo 0,5 unidades de cada enzima.

### 3.8.6. Ligaçãõ de fragmentos de DNA

As reações de ligaçãõ foram feitas em sistemas de 10 µL contendo 0,3 unidades Weiss, nos quais inserto e vetor foram adicionados com razão molar de aproximadamente

3:1 entre as pontas de cada fragmento, respectivamente. Geralmente, isso representou cerca de 1  $\mu\text{L}$  de inserto para 0,2-0,5  $\mu\text{L}$  de vetor. Os sistemas foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante (Fermentas), incubados a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos, e então transformados em *E. coli*.

#### 3.8.7. Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), sem modificações significativas.

#### 3.8.8. Análise eletroforética do DNA

Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão BE (borato de sódio 5mM; EDTA 0,5 mM). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a 60-80 V por 40-60 minutos; após isso, o gel foi incubado com brometo de etídeo 0,002%, e visualizado sob luz UVC (254 nm).

#### 3.8.9. Preparação dos vetores para ligação

Os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas em sistemas de 40  $\mu\text{L}$ , e então incubados com 0,2 U de Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) por 1h 40 min a 37°C. As enzimas foram inativadas mediante incubação a 80°C por 15 min. Os vetores cortados e desfosfatizados foram purificados com o kit Illustra Gfx (GE Healthcare), e a concentração e pureza do DNA foi estimada por espectrofotometria.

#### 3.8.10. Preparação de vetor pTZ57R para clonagem TA

O protocolo de preparação de um vetor possuidor de pontas adesivas 3' contendo adenina foi descrito por Marchuk *et al* (1990), e usado com poucas modificações. Cerca de 100  $\mu\text{g}$  de vetor pTZ57R foi digerido com 10 unidades de EcoRV em sistema de 50  $\mu\text{L}$  contendo tampão R (Fermentas). Após a 24h de reação, o sistema foi diluído para volume final de 10  $0\mu\text{L}$ , e a esse sistema se adicionou 1 mM de dTTP e 2  $\mu\text{L}$  de MASOTaq. O sistema foi incubado a 72°C por 4h. Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram congeladas para uso posterior. O vetor assim preparado foi denominado pTZ57R/T

#### 3.8.11. Quantificação do DNA por espectrofotometria

A concentração do DNA foi estimada pela absorvância da amostra em 260 nm, medida em um aparelho Nanodrop 2000 (Thermo-Fischer Scientific). A pureza da amostra foi inferida pela relação absorvância 260 nm/absorvância 280 nm, sendo consideradas puras as amostras em que essa relação se aproximava de 2.

### 3.9. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE EM *E. coli*

Células de *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) abrigando o plasmídeo pRT22 e os plasmídeos codificantes para as variantes de NifA e/ou PII foram cultivadas em meio LB contendo os antibióticos apropriados a 37°C por 12h. Após esse período, 50  $\mu$ L de cada cultura foram repicados para 3 mL de meio NFDM suplementado com 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 3% de LB, mais os antibióticos. Os inóculos foram incubados a 37°C por 24h. A partir desses inóculos, foram feitos os inóculos definitivos em NFDM suplementado com 0,02% de casaminoácidos, IPTG (0, 5  $\mu$ M ou 5 mM), e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0, 20 ou 40 mM), com  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial de 0,2 ( $l=1\text{cm}$ ). Os frascos foram selados com rolhas de borracha, e submetidos a troca de ar por gás argônio por 30 minutos. As células foram incubadas por 6 horas a 30°C e 120 rpm, e 100  $\mu$ L de cada cultura foram usados para o ensaio de atividade da  $\beta$ -galactosidase, conforme descrito por Miller (1972). A degradação do ONPG, a presença de restos celulares e a densidade óptica das culturas foram quantificadas por espectrofotometria (415 nm, 550 nm, e 595 nm, respectivamente) em um leitor de microplaca EL<sub>x</sub>800 (BioTek –  $l=6\text{mm}$ ), e a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi calculada segundo a equação:

$$\frac{1000(\text{DO}_{415} - 1,75(\text{DO}_{550}))}{(\text{volume})(\text{DO}_{595})(\text{tempo de reação})}$$

### 3.10. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS

#### 3.10.1. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem da concentração de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), adaptado para leitura em leitor de microplaca. A proteína BSA foi utilizada para fazer a curva-padrão de concentração de proteína. A leitura de  $\text{DO}_{595\text{nm}}$  foi feita em placa de 96 poços no equipamento EL<sub>x</sub>800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek instruments Inc.), sendo que cada poço continha 30  $\mu$ L de amostra e 170  $\mu$ L do reativo de Bradford.

### 3.10.2. Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese desnaturante de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida 12% ou 15%, conforme descrito por Laemmli, (1970). As amostras contendo proteína foram diluídas em tampão de amostra desnaturante (60 mM TrisHCl, 10% glicerol, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8), e aquecidas a 90°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. As amostras foram submetidas a 150 V por 60 minutos em tampão de corrida (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 0,1% SDS), e coradas com solução corante de azul de Coomassie (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético, 0,55 g/L Brilliant Blue R). O excesso de corante foi removido com solução descorante (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético). A composição dos géis está descrita abaixo:

TABELA 8 – GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (RECEITA PARA DOIS GÉIS)

Gel separador	(12%)	(15%)	Gel de empilhamento (4%)	
H <sub>2</sub> O	4,35 mL	3,645 mL	H <sub>2</sub> O	3,162 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,3 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	SDS 10%	50 $\mu$ L
Acrilamida 40%	3 mL	3,75 mL	Acrilamida 40%	487,5 $\mu$ L
APS 10%	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	APS 10%	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	TEMED	10 $\mu$ L

### 3.10.3. Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida não desnaturante

A eletroforese não-desnaturante (nativa) foi feita em gel de poliacrilamida, mas na concentração de 12%. A composição dos géis pode ser vista abaixo:

TABELA 9 – GEL PARA ELETROFORESE NATIVA (RECEITA PARA DOIS GÉIS)

Gel separador (12%)		Gel de empilhamento (4%)	
H <sub>2</sub> O	6,35 mL	H <sub>2</sub> O	3,162 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,3 mL
Acrilamida 40%	1 mL	Acrilamida 40%	487,5 $\mu$ L
APS 10%	100 $\mu$ L	APS 10%	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	TEMED	10 $\mu$ L

O tampão de corrida utilizado continha 3 g/L Tris e 14,4 g/L glicina. As corridas foram feitas por 3 horas a 10 mA (cerca de 100V). O tampão de amostra utilizado continha exclusivamente 25% de glicerol.

#### 3.10.4. Expressão e purificação de hisN185

Para a expressão de hisN185 (resíduos 185-542 de NifA fusionados a uma cauda de histidinas N-terminal) em larga escala (para purificação), uma cultura de 4 mL de BL21( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pETN185 foi crescida até a fase estacionária, e então inoculada em 400 mL de meio LB contendo 50  $\mu$ g/mL de kanamicina, e cultivados a 37°C e 180 rpm por ~3h, até  $DO_{600nm}$  entre 0,6 e 0,8 ( $l=1$ cm). Após esse período de crescimento, adicionou-se 0,5 mM IPTG, 200  $\mu$ M citrato férrico, e 50  $\mu$ M L-metionina à cultura, e incubou-se as células a 18°C e 150 rpm por 12 horas. Após a expressão, a cultura foi centrifugada e o pellet de células foi estocado a -20°C para uso posterior.

A proteína hisN185 foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando o sistema AKTA (Amersham Biosciences). As células foram ressuspensas em 20 mL de tampão A (50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol) e lisadas por sonicação em um aparelho Sonicator Ultrasonic Processor XL (Heat Systems), com 15 ciclos de [15 segundos de sonicação/1 minuto de repouso], para evitar o aquecimento da amostra. A potência máxima utilizada foi de 15%. O extrato celular foi submetido a centrifugação a 15000 rpm por 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Hitachi Himac CR21, usando o rotor nº 46. O sobrenadante foi injetado em uma coluna Hi trap Chelating 1 mL (Pharmacia) carregada com íons  $Co^{++}$  à velocidade de 0,5 mL/min. A coluna foi lavada com dez volumes (10 mL) de tampão A, 2 volumes de tampão B (50 mM Tris-HCl pH8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 1 M imidazol) 10%, e a proteína hisN185 foi eluída com um gradiente de 10 a 100% de tampão B em 15 volumes de coluna (15 mL). As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e aquelas que continham a proteína hisN185 suficientemente pura foram usadas em ensaios subsequentes.

#### 3.10.5. Expressão e purificação de G185his

Para a expressão de G185his (resíduos 1-184 de NifA fusionados a uma cauda de histidinas C-terminal) em larga escala (para purificação), uma cultura de 4 mL de BL21( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pETG185his foi crescida até a fase estacionária, e então inoculada em 400 mL de meio LB contendo 50  $\mu$ g/mL de kanamicina, e cultivados a 37°C e 180 rpm por ~3h, até  $DO_{600nm}$  entre 0,6 e 0,8 ( $l=1$ cm). Após esse período de crescimento, adicionou-se 0,5 mM IPTG à cultura, e incubou-se as células a 18°C e 150 rpm por 12 horas. Após a expressão, a cultura foi centrifugada e o pellet de células foi estocado a -20°C para uso posterior.

A proteína G185 foi purificada com duas etapas de cromatografia, ambas utilizando o sistema ÄKTA. Inicialmente, as células foram ressuspensas em 20 mL de tampão A-QFF (50 mM HEPES pH 8,0, 50 mM NaCl) e lisadas por sonicação em um aparelho Sonicator

Ultrasonic Processor XL (Heat Systems), com 15 ciclos de [15 segundos de sonicação/1 minuto de repouso]. A potência máxima utilizada foi de 15%. O extrato celular foi submetido a centrifugação a 15000 rpm por 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Hitachi Himac CR21, usando o rotor n° 46. O sobrenadante foi filtrado através de lã de vidro (Whatman cat. No. 1823-025) e injetado em duas colunas Hi trap QFF 1 mL (Pharmacia) in tandem à velocidade de 1mL/min. A coluna foi lavada com dez volumes (10 mL) de tampão A-QFF, e então foi feita a eluição com um gradiente de 0 a 100% de tampão B-QFF (50mM HEPES pH 8,0, 1M NaCl) em 15 volumes de coluna (15 mL). As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e aquelas que continham a proteína G185his foram recolhidas para a segunda etapa de purificação.

Na segunda etapa de purificação, as frações contendo G185his foram injetadas em uma coluna Hi trap Chelating 1 mL (Pharmacia) carregada com íons  $\text{Co}^{++}$  à velocidade de 0,5mL/min. A coluna foi lavada com dez volumes (10 mL) de tampão A-Co (50 mM HEPES pH8,0, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol), e a proteína G185his foi eluída com um gradiente de 0 a 100% de tampão B-Co (50 mM HEPES pH8,0, 150 mM NaCl, 1 M imidazol) em 15 volumes de coluna (15 mL). As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e aquelas que continham a proteína G185his suficientemente pura foram usadas em ensaios subseqüentes.

#### 3.10.6. Expressão e purificação de GlnK de *H. seropedicae*

A expressão e purificação de GlnK de *H. seropedicae* seguiram o protocolo descrito por Moure *et al.* (2011), com poucas modificações. A proteína foi expressa em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) a partir do plasmídeo pEMB200. O pellet de células foi ressuspendido em 20 mL de tampão A-hep (50 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl), lisadas por sonicação, e o extrato bruto foi aquecido a 70°C por 15 minutos. O extrato foi centrifugado a 15000 rpm por 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Hitachi Himac CR21, usando o rotor n° 46. O sobrenadante foi injetado a 1 mL/min em uma coluna Hitrap Heparin (Pharmacia) 1mL. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A-hep, e a proteína foi eluída com um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B-hep (50 mM HEPES pH 8,0, 1 M NaCl). As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e aquelas que continham a proteína GlnK suficientemente pura foram usadas em ensaios subseqüentes.

#### 3.10.7. Análise de proteínas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)

Uma coluna Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare – 17-5173-01) foi equilibrada com tampão (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0) usando o sistema ÄKTA (GE Healthcare) de cromatografia líquida. Duzentos microlitros de uma amostra de proteína

purificada foram injetados a 0,5 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE. O cromatograma gerado para cada corrida foi analisado com o programa Unicorn 5.1 (GE Healthcare). Para a determinação das massas moleculares das proteínas analisadas, foi feita uma curva de calibração com o kit MWGF200 (Sigma), que contém 5 proteínas com massa molecular conhecida.

#### 3.10.8. Ensaio de ligação cruzada (*crosslinking*) in vitro

Os ensaios de reação cruzada foram feitos em sistemas de 10-50  $\mu$ L contendo 50 mM HEPES, 200 mM NaCl (pH 8,0), 8mM  $MgCl_2$  e 4  $\mu$ M de cada proteína envolvida. O agente de ligação cruzada (formaldeído) foi adicionado para concentração final de 0,5%. Quando os efetores de PII foram adicionados aos sistemas de reação, suas concentrações finais foram 2 mM (2OG) e 3 mM (ATP ou ADP). A reação foi parada com adição de um volume de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, usando um tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### 3.10.9. Ensaio de co-precipitação (*pull-down*)

Os ensaios de *pull-down* foram feitos utilizando 10  $\mu$ L de beads de TALON MagneHis (Promega) e 4  $\mu$ M de cada proteína utilizada. Em cada ensaio, a resina foi lavada duas vezes com 100  $\mu$ L de água ultrapura e duas vezes com tampão de interação (50 mM HEPES pH 8,0, 200 mM NaCl, 8 mM  $MgCl_2$ , 20 mM imidazol). Após isso, as beads foram incubadas com 100  $\mu$ L de tampão de interação contendo a proteína com cauda de histidinas, por 20 minutos. Após isso, as beads foram lavadas duas vezes com 100  $\mu$ L de tampão de interação, e incubadas por 20 minutos com tampão de interação contendo a proteína sem cauda de histidinas. As beads foram lavadas novamente duas vezes com 100  $\mu$ L de tampão de interação, fervidas com 30  $\mu$ L de tampão de amostra, e analisadas por SDS-PAGE. Quando os efetores de PII foram adicionados aos sistemas de reação, suas concentrações finais foram 2 mM (2OG) e 3 mM (ATP ou ADP).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES PROTEÍNAS PII SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA DE *H. seropedicae*

O efeito de diferentes proteínas PII sobre a proteína NifA de *H. seropedicae* foi determinado in vivo em *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) hospedando o plasmídeo pRT22, que contém o promotor *nifH* de *K. pneumoniae* clonado a montante do gene *lacZ*. O gene *NifA* e cada gene que codifica para as proteínas PII usadas neste trabalho foram clonados no vetor pETDuet1, cada uma em um de seus dois sítios de policlonagem, para que pudessem ser coexpressas a partir de um mesmo plasmídeo. Ambas as proteínas foram expressas a partir de promotor T7 nas condições de cultivo descritas no item 3.9, e então as culturas foram usadas para determinação de atividade de  $\beta$ -galactosidase. A detecção de atividade dessa enzima implica que seu gene foi transcrito a partir do promotor *nifH* de pRT22, o que só pode ocorrer caso NifA tenha sido ativada por PII.

#### 4.1.1. Construção dos plasmídeos DNifA, DHsglnK, e DN185

Os genes *NifA*, *NifAN185*, e *glnK* de *H. seropedicae* foram amplificados utilizando os plasmídeos pRAM1, pETN185, e pEMB200 como DNA molde para uma reação de PCR empregando os primers T7F *grd* e *hsNifA2AKpn*, T7F *grd* e *hsNifA2AKpn*, e T7F *grd* e pET28a *Kpn rev2*, respectivamente. Os produtos de PCR foram ligados ao vetor pTZ57R/T, transformados em *E. coli* TOP10, e plaqueados em LA contendo ampicilina e Xgal. Colônias brancas foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos. Os plasmídeos foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Os plasmídeos contendo o gene *NifA* (cerca de 1800 bp), *glnK* (cerca de 500 bp) e *NifAN185* (cerca de 1400 bp) foram denominados pAASNifAKTZ, pAASHsglnKkTZ e pAASN185kTZ (cerca de 1400 bp). O seqüenciamento desses plasmídeos confirmou a ausência de mutações.

Os plasmídeos pAASNifAKTZ, pAASHsglnKkTZ e pAASN185kTZ foram digeridos com as enzimas NdeI e KpnI. Os produtos de digestão foram ligados a pETDuet1 digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e plaqueada em LA contendo ampicilina e Xgal. Colônias brancas foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos, que foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Os clones obtidos foram denominados DNifA, DN185, e DhsglnK, respectivamente.

#### 4.1.2. Subclonagem de genes de diferentes proteínas PII em DNifA

Os plasmídeos pETHsglnB, pEMB200, pTRPETglnB, pLH25, pMSA4, pGlnB\_42-54, pGlnZ\_42-54, pMSGlnBZ1, e pMSGlnZB1 foram digeridos com as enzimas XbaI e BamHI, e clonados no MCSI do plasmídeo DNifA digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e plaqueada em LA contendo ampicilina. Colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos, que foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Os clones que continham os insertos corretos foram denominados HsglnBDNifA, HsglnKDNifA, EcglnBDNifA, AbglnBDNifA, AbglnZDNifA, AbdeltaTglnBDNifA, AbdeltaTglnZDNifA, AbB91ZDNifA, e AbZ48BDNifA, respectivamente.

#### 4.1.3. Subclonagem de genes de diferentes proteínas PII em DN185

Os plasmídeos pEMB200, pLH25, pMSA4, pGlnB\_42-54, e pGlnZ\_42-54 digeridos com as enzimas XbaI e BamHI foram ligados ao plasmídeo DN185 digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e plaqueada em LA contendo ampicilina. Colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos, que foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Os clones que continham os insertos corretos foram denominados HsglnKDN185, AbglnBDN185, AbglnZDN185, AbdeltaTglnBDN185, e AbdeltaTglnZDN185, respectivamente.

#### 4.1.4. Construção do plasmídeo HsdeltaTglnKDNifA

O plasmídeo pEMB200 foi usado como DNA molde para duas reações de PCR, uma empregando os primers T7F grd e hsglnKdeltaTloop r e outra empregando os primers hsglnKdeltaTloop f e T7term grd. Os produtos dessas duas PCRs foram misturados e usados como DNA molde para uma nova reação de PCR, usando os primers T7F grd e T7term grd. O produto dessa amplificação foi ligado ao vetor pTZ57R/T, transformado em *E. coli* TOP10, e plaqueado em LA contendo ampicilina e Xgal. Colônias brancas foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos. Os plasmídeos foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Plasmídeos contendo um inserto de tamanho correto (cerca de 400 bp) foram seqüenciados com o primer universal. Um plasmídeo contendo o gene *glnK* com a deleção de bases esperada foi denominado pAASHsdeltaTglnKTZ, e foi usado nas etapas subsequentes do trabalho.

O plasmídeo pAASHsdeltaTglnKTZ foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI. O produto de digestão foi ligado a pET29a digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e plaqueada em LA contendo kanamicina. Colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos, que foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Um plasmídeo contendo o

inseto de tamanho correto (cerca de 500 bp) foi selecionado, e denominado pAASHdeltaTglnK29. Esse plasmídeo foi digerido com XbaI e BamHI, e seu inserto foi clonado no MCS1 do plasmídeo DNifA (conforme já descrito em anteriormente), gerando o plasmídeo HsdeltaTglnKDNifA.

#### 4.1.5. Determinação da atividade de NifA coexpressa com proteínas PII

Os plasmídeos pETDuet1, DHsglnK, DNifA, HsglnBDNifA, HsglnKDNifA, HsdeltaTglnKDNifA, EcglnBDNifA, AbglnBDNifA, AbglnZDNifA, AbdeltaTglnBDNifA, AbdeltaTglnZDNifA, AbB91ZDNifA, AbZ48BDNifA, HsglnKDN185, AbglnBDN185, AbglnZDN185, AbdeltaTglnBDN185, e AbdeltaTglnZDN185 foram transformados em *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pRT22. As bactérias foram então utilizadas em ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados são sumarizados no gráfico abaixo:

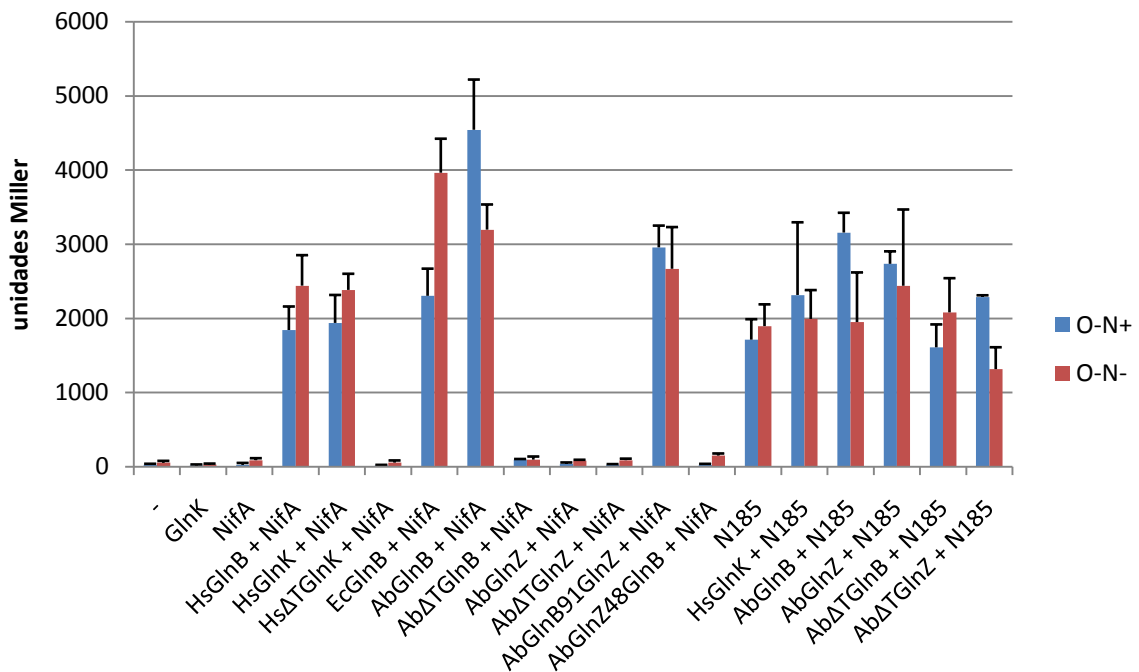


FIGURA 9 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO NIFA E DIFERENTES PROTEÍNAS PII. As células foram cultivadas conforme descrito em 3.9 em alta (+20mM) ou baixa (+0mM) concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , na presença de 5  $\mu\text{M}$  de IPTG para indução da expressão das proteínas.

Os resultados mostram que, nas condições testadas, as proteínas PII de *H. seropedicae* (GlnB e GlnK), a proteína GlnB de *E. coli*, e a proteína GlnB de *A. brasilense* foram capazes de ativar a proteína NifA de *H. seropedicae*. A proteína GlnZ de *A. brasilense* não foi capaz de ativar NifA, e a proteína quimérica que contém os primeiros 48 aminoácidos de GlnZ também não o foi. Isto está de acordo com o observado por Sotomaior e

colaboradores (2012); eles observaram que GlnZ não é capaz de interagir com o domínio GAF de NifA de *A. brasilense* in vitro, ao passo que GlnB o é.

O experimento sugere que os resíduos essenciais para a ativação de NifA por PII (1) são conservados entre as proteínas GlnB de *E. coli*, *H. seropedicae*, e *A. brasilense* e GlnK de *H. seropedicae*, e não estão presentes em GlnZ de *A. brasilense*; e (2) devem se encontrar entre os primeiros 48 resíduos das proteínas PII.

As variantes de PII cujo T-loop foi deletado não foram capazes de ativar NifA; isso sugere que essa região da proteína é importante para a interação ou transmissão do sinal de ativação para NifA.

A variante N185 de NifA, que possui deleção do domínio N-terminal e é ativa independentemente da presença de PII, permaneceu ativa na presença de todas as proteínas PII testadas.

Os resultados apresentados na figura 9 também mostram que não houve regulação da atividade de NifA por nitrogênio nesse sistema de expressão. Isso está em desacordo com observações da regulação de NifA por PII em *H. seropedicae* (vide NOINDORF *et al.*, 2011), segundo as quais PII só é capaz de ativar NifA em baixas concentrações de nitrogênio quando expressa a partir de seu próprio promotor em *H. seropedicae*. A diferença desses resultados e dos obtidos neste trabalho pode estar relacionada com o alto nível de expressão das proteínas a partir do promotor T7 em *E. coli*. Para tentar entender as razões dessa diferença, foi feito o mesmo experimento na presença de concentrações maiores de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , usando apenas a proteína GlnK de *H. seropedicae* como ativadora de NifA. Os resultados são mostrados na figura abaixo.

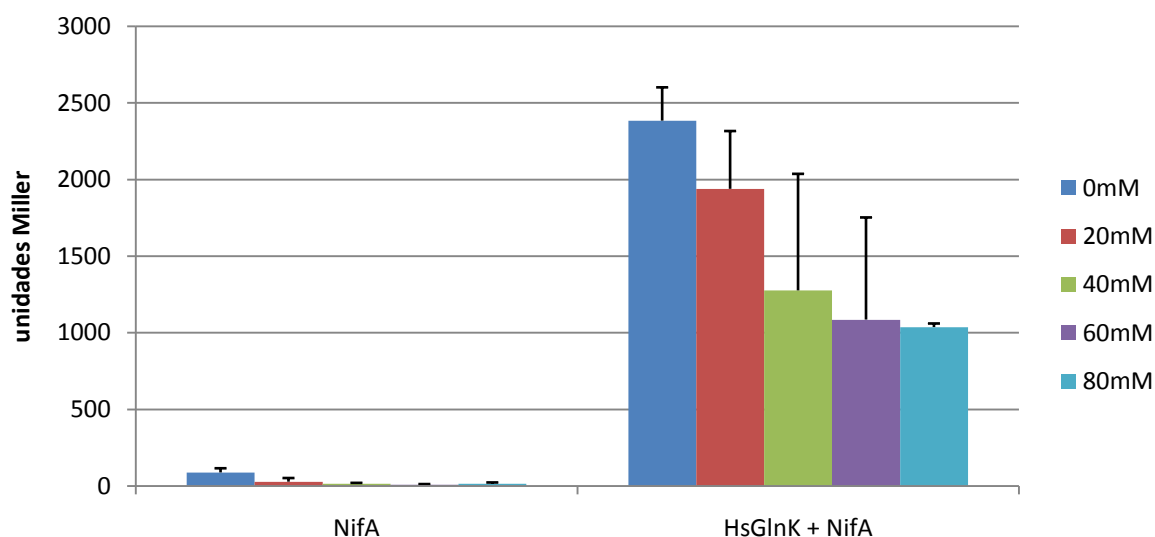


FIGURA 10 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109(λDE3) EXPRESSANDO NIFA E GlnK EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIO. As células foram cultivadas conforme descrito em 3.9 suplementadas com 20, 40, 60, e 80mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , na presença de 5μM de IPTG para indução da expressão das proteínas.

Conforme aumenta a concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  disponibilizado para a células, diminui a ativação de NifA por GlnK. Esse efeito possivelmente se deve à presença de alguma quantidade de PII uridililada e/ou ligada a 2OG (situação que sinaliza a carência de nitrogênio intracelular) mesmo durante o cultivo em altas concentrações de nitrogênio. A ativação de NifA por essa pequena subpopulação de PII pode estar sendo favorecida nesse sistema de superexpressão (os resultados da seção 4.4, discutidos posteriormente, também suportam essa hipótese).

Para verificar se a presença de GlnK não uridililada seria detectável em sistemas de expressão contendo alta concentração de nitrogênio, foi feito o cultivo das células nas mesmas condições descritas em 3.9, na presença de 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,5 mM de IPTG (para superexpressão). Amostras de 1 mL de cada cultura foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão contendo 50 mM TrisHCl pH 8,0 e 100 mM NaCl, sonicadas, e analisadas por cromatografia em gel de poliacrilamida não-desnaturante. As bandas foram reveladas com azul de Coomassie. O gel desse experimento é mostrado na figura 11.

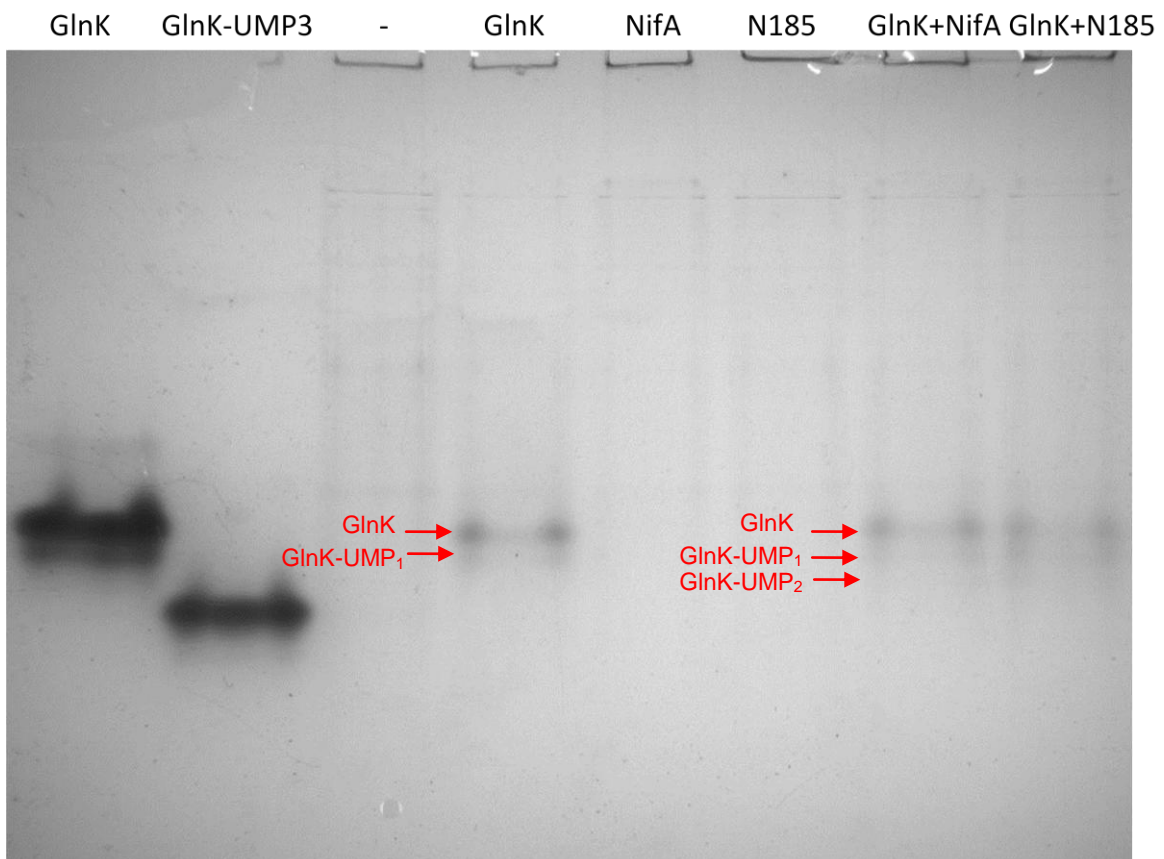


FIGURA 11– ELETROFORESE EM GEL NATIVO 12% DE 10 $\mu\text{g}$  DE EXTRATO DE *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO NIFA OU N185 E GLNK EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO. GlnK e GlnK-UMP<sub>3</sub> foram aplicadas nas linhas 1 e 2 para servirem como padrão de migração. As proteínas superexpressas em cada extrato analisado estão escritas logo acima de suas respectivas linhas. As flechas indicam a presença de GlnK, GlnK-UMP<sub>1</sub>, e GlnK-UMP<sub>2</sub> nos extratos.



Os resíduos de número 5, 31, 42, 45, 52, 54, 61, 70, 94, 108, e 110 parecem ser mais ou menos conservados entre as proteínas PII capazes de ativar NifA e não-conservados na proteína GlnZ. Esses resíduos foram selecionados para mutagênese pontual do gene *glnK* de *H. seropedicae*, com o objetivo de substituir cada um desses resíduos por seus equivalentes em GlnZ de *A. brasilense*. Os resultados dos experimentos anteriores com as quimeras GlnBZ1 e GlnZB1 sugerem que há maior probabilidade de envolvimento dos resíduos 5, 31, 42 e 45 na ativação de NifA.

Aparte esses resíduos de aminoácidos, selecionou-se também para mutagênese os resíduos conservados Y51 (que é modificado por uridililação), K58 (essencial para a ligação de 2-oxo-glutarato), e G89 (essencial para a ligação de ATP e ADP – JIANG *et al.*, 1997), a fim de avaliar o efeito causado pela disrupção da detecção de sinais ambientais por GlnK sobre a proteína NifA.

O modelo espacial abaixo mostra a localização desses resíduos na proteína GlnZ de *A. brasilense*, na presença de efetores (TRUAN *et al.*, 2011):

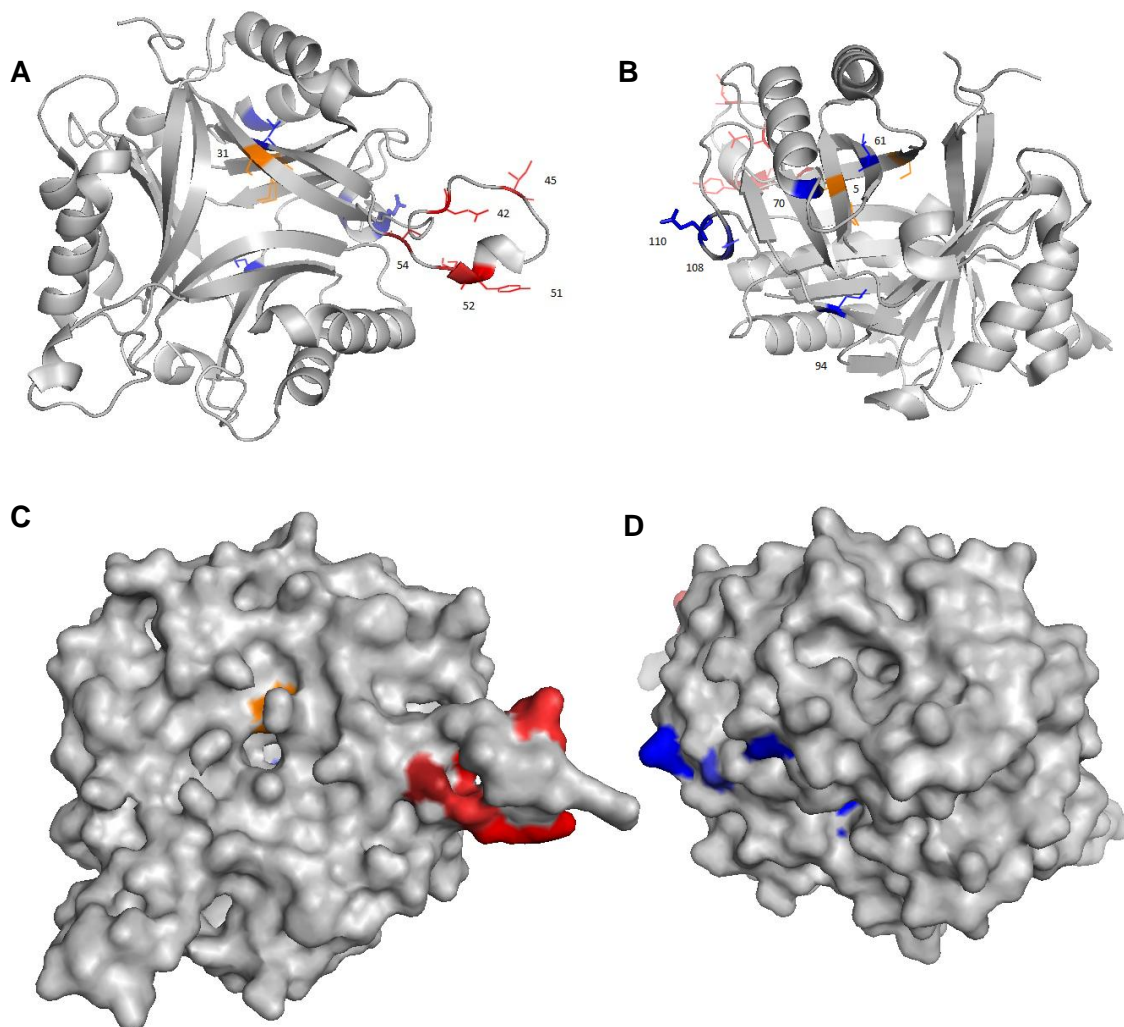


FIGURA 14 – MODELO ESTRUTURAL DE GlnZ DE *A. brasilense*, COM OS RESÍDUOS CONSERVADOS ENTRE GlnB DE *H. seropedicae*, *E. coli*, *A. brasilense*, E GlnK DE *H. seropedicae*, MAS NÃO CONSERVADOS EM GlnZ DE *A. brasilense* MOSTRADOS EM DIFERENTES CORES. Resíduos N-terminais em relação ao T-loop estão marcados em laranja; resíduos do T-loop, em vermelho; e resíduos C-terminais ao T-loop, em azul. (A) Vista da face do T-loop, destacando a

localização dos resíduos 31, 42, 45, 51, 52, e 54. (B) Vista de uma parte da lateral e da face oposta ao T-loop, destacando a localização dos resíduos 5, 61, 70, 94, 108, e 110. (C) Vista da face do T-loop em modelo de preenchimento espacial. (D) Vista de uma parte da lateral e da face oposta ao T-loop em modelo de preenchimento espacial.

Note-se que, aparte os resíduos importantes para a ligação de efetores e dos resíduos 5 e 61, os demais se localizam na superfície da proteína.

#### 4.3. CONSTRUÇÃO DE MUTANTES PONTUAIS DE *GlnK* DE *H. seropedicae*

As variantes do gene *glnK* codificando proteínas mutantes foram produzidas de acordo com a seção 3.8.3. Os produtos dessas reações foram clonados inicialmente no vetor pTZ57R/T, transformados em *E. coli* TOP10, e plaqueados em LA contendo ampicilina e Xgal. Colônias brancas foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos. Os plasmídeos foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Plasmídeos contendo um inserto de tamanho correto (cerca de 500 bp) foram seqüenciados com o primer universal. Os plasmídeos contendo as variantes do gene *glnK* com as mutações esperadas foram digeridos com as enzimas NdeI e BamHI. Os produtos de digestão foram ligados a pET29a digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e plaqueada em LA contendo kanamicina. Colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos, que foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Plasmídeos contendo os insertos corretos foram selecionados, digeridos com XbaI e BamHI, e seus insertos foram clonados no MCSI do plasmídeo DNifA (conforme já descrito em anteriormente). Os nomes de todos os plasmídeos gerados nesse processo podem ser encontrados na tabela 1.

Até a data da redação deste trabalho, nem todos os mutantes descritos na seção anterior foram construídos com sucesso; os mutantes T5M, T31S, H42Q, L45I, K58M, I61V, e V70Y não foram obtidos ligados a DNifA.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NifA COEXPRESSA COM PROTEÍNAS *GlnK* CONTENDO MUTAÇÕES PONTUAIS

Os plasmídeos adequados foram transformados em *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pRT22. As bactérias foram então utilizadas em ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados são sumarizados no gráfico abaixo:

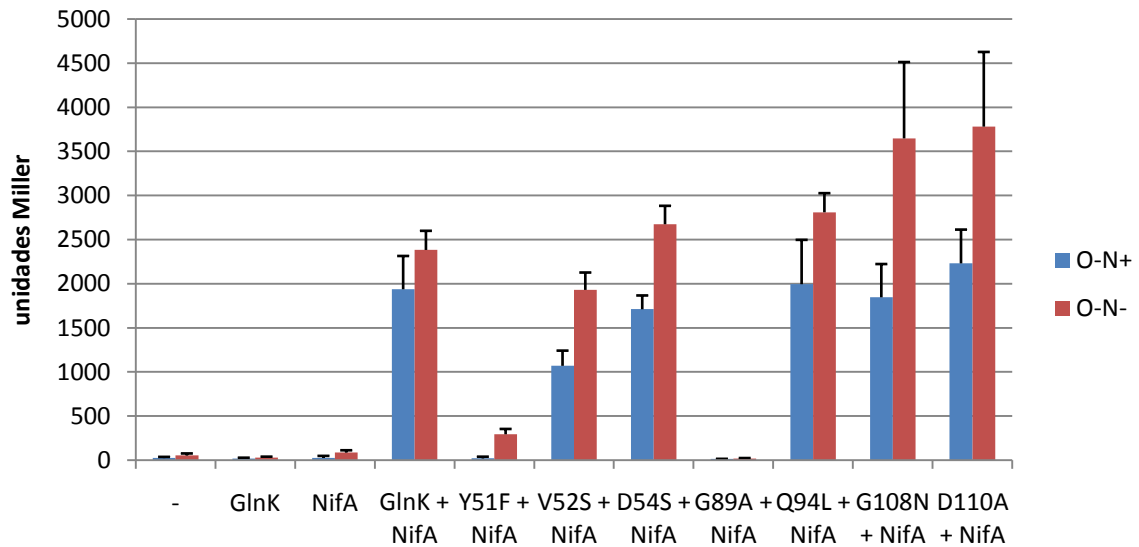


FIGURA 15 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109(λDE3) EXPRESSANDO NIFA E DIFERENTES MUTANTES PONTUAIS DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae*. As células foram cultivadas conforme descrito em 3.9 em alta (+20 mM) ou baixa (+0 mM) concentração de NH<sub>4</sub>Cl, na presença de 5 μM de IPTG para indução da expressão das proteínas.

Uma vez que o nível de expressão de PII e NifA não é alto o bastante para discernir suas bandas em uma análise por SDS-PAGE (dados não mostrados), uma repetição do experimento acima foi executada usando 0,5mM de IPTG, para gerar superexpressão. Para confirmar se todas as proteínas estavam sendo expressas corretamente, um mililitro de cada cultura foi centrifugado, e os pellets foram ressuspensos em tampão de sonicação (50 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl) e sonicados. Dez microgramas de cada proteína foram analisados por SDS-PAGE. Todas as proteínas foram corretamente expressas, como se pode ver na figura 16.

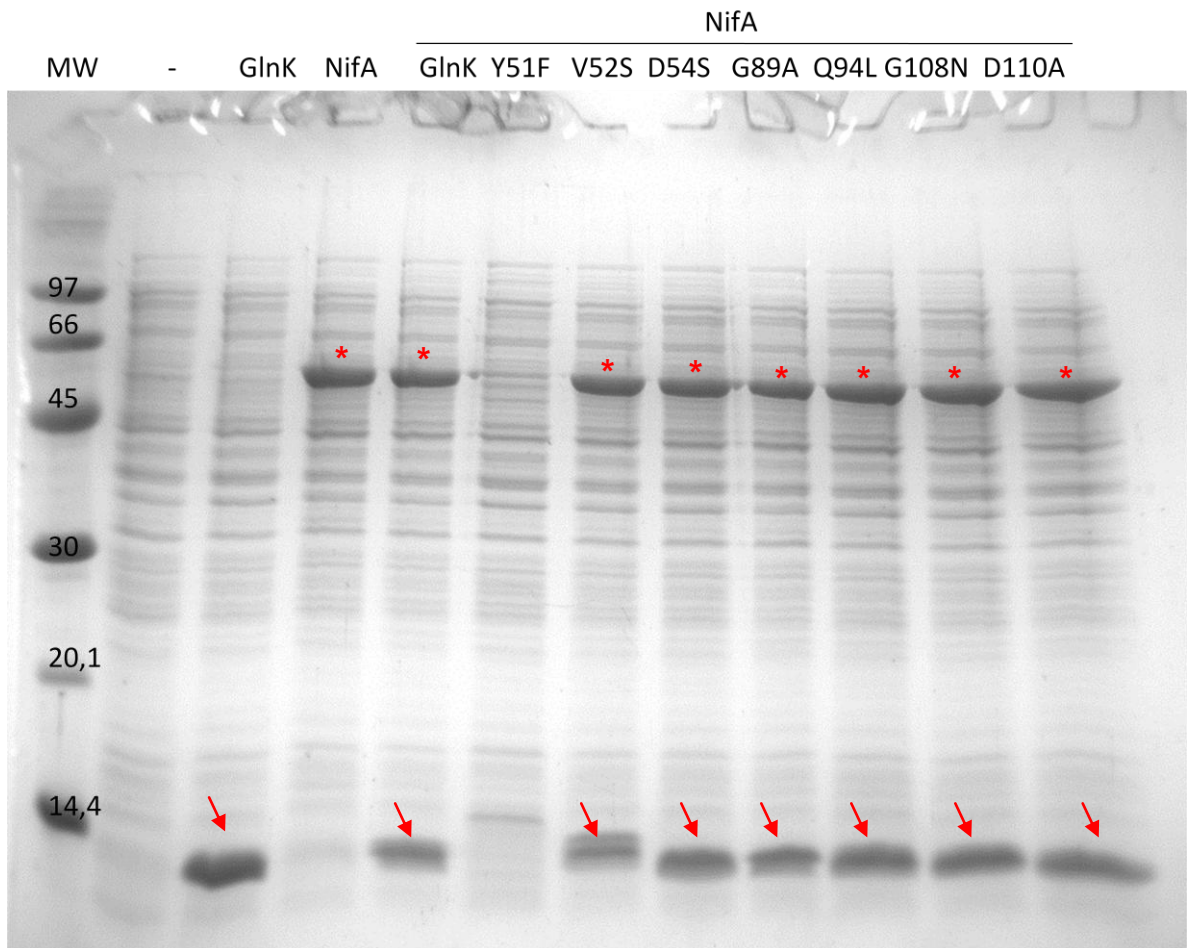


FIGURA 16 – ELETROFORESE DE EXTRATOS DE *E. coli* JM109(λDE3) EXPRESSANDO NIFA E MUTANTES PONTUAIS DE GlnK DE *H. seropedicae* EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE. As proteínas PII estão indicadas por uma seta; as proteínas NifA estão indicadas por um asterisco. MW, marcador de massa molecular (kDa). As mutações listadas no topo de cada linha se referem à proteína GlnK.

Todas as proteínas expressaram bem; a proteína GlnK Y51F não expressou corretamente neste experimento, porém expressou perfeitamente bem em outros (vide figura 20 adiante). A atividade de β-galactosidase determinada a partir dessas culturas mostrou um padrão semelhante ao da figura 15, com exceção de GlnK Y51F, cuja atividade será discutida adiante nesta seção .

Os resultados mostram que as mutações pontuais feitas na porção C-terminal da proteína não impediram que houvesse ativação de NifA, sugerindo que essa região da proteína PII não é importante para a ativação. Isso corrobora o observado nos experimentos com a químera GlnBZ1.

As mutações dos resíduos 52 e 54 não resultaram na perda da capacidade de ativar NifA, embora o mutante V52S tenha uma ligeira redução nessa capacidade.

A mutação Y51F gera uma proteína GlnK com um fenótipo totalmente distinto dos demais. Essa proteína é capaz de ativar parcialmente NifA quando as concentrações de nitrogênio são baixas. Uma vez que GlnK Y51F não pode ser uridililada, o sinal recebido por essa proteína deve ser a ligação a seus efetores. Isso é sugerido também pelo fenótipo de

GlnK G89A, que não deve ser de ligar ATP, ADP e 2OG; essa proteína é incapaz de ativar NifA em quaisquer das circunstâncias testadas. A ativação parcial de NifA por uma variante Y51F de PII já havia sido observada em *R. rubrum* (ZHANG *et al.*, 2000), embora não em *A. brasilense*.

Considerando que o nível de expressão de PII e de NifA poderia afetar a atividade de  $\beta$ -galactosidase detectada nesses ensaios, foram feitos novos ensaios em condição de expressão mínima das duas proteínas (ausência de IPTG), expressão padrão (com 5  $\mu$ M de IPTG), e superexpressão (0,5 mM de IPTG), usando os plasmídeos DNifA, HsglnKDNifA, e HsglnKY51FDNifA. Os resultados são mostrados no gráfico:

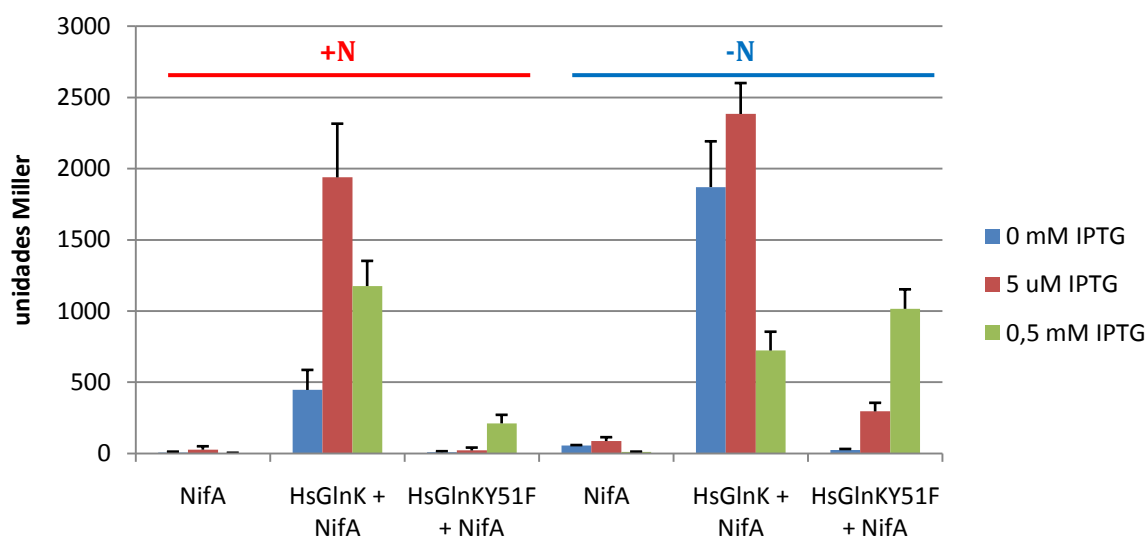


FIGURA 17 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO NIF A GlnK, E GlnK Y51F COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG. As células foram cultivadas conforme descrito em 3.9 em alta (+2 0mM) ou baixa (+0 mM) concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , na presença de 5  $\mu$ M de IPTG para indução da expressão das proteínas.

Perceba-se que:

1. A proteína NifA expressa sem coexpressão de PII não é ativa em nenhuma circunstância.
2. A proteína NifA coexpressa com GlnK tem atividade baixa em altas concentrações de nitrogênio no sistema de expressão mínima (portanto, está sendo parcialmente regulada). Nos sistemas de expressão padrão e de superexpressão, a atividade não é regulada.
3. A proteína NifA coexpressa com GlnK Y51F é inativa em altas concentrações de nitrogênio quando sua expressão é baixa, mas é parcialmente ativa quando superexpressa. Em baixa concentração de nitrogênio, é parcialmente ativa no sistema de expressão padrão, mas tem atividade idêntica à promovida por GlnK no sistema de superexpressão.

Esses dados sugerem que GlnKY51F é capaz de ativar NifA; a baixa atividade observada pode ser aumentada com o aumento de sua expressão. Isso parece indicar que a diferença entre GlnK selvagem e esse mutante é em sua afinidade por NifA, o que contradiz os experimentos de proteólise limitada feitos por Oliveira e colaboradores (2012); nesse trabalho, os autores concluíram que tanto GlnK quanto GlnK-UMP<sub>3</sub> são capazes de interagir com o domínio GAF de NifA, e que a interação de GlnK e GAF é mais forte que a interação entre GlnK-UMP<sub>3</sub> e GAF, e insensível aos efetores de PII. Duas possibilidades se apresentam para resolver a contradição: (1) a afinidade de NifA por GlnK-UMP pode ser maior do que por GlnK, a despeito de Oliveira e colaboradores (2012), conforme sugerido pelos resultados da figura 1. Os ensaios de proteólise limitada são de difícil interpretação, pois avaliaram um aumento na taxa de degradação de GAF na presença de GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub>. Esse aumento da degradação de GAF deve ter sido provocado pela exposição de regiões passíveis de clivagem durante a interação; no entanto, não há como saber se a superfície de interação é a mesma para GlnK e GlnK-UMP<sub>3</sub>, ou se a interação com GlnK-UMP<sub>3</sub> não teria um efeito protetor sobre algum trecho de GAF que estaria exposto durante a interação com GlnK. É possível que a interação forte entre GlnK e GAF seja um artefato dessa técnica. (2) a afinidade de NifA por GlnK pode ser alta, conforme Oliveira e colaboradores (2012). Nesse caso, o aumento da atividade de NifA na presença de altas concentrações de GlnK Y51F teria de ser explicado exclusivamente pela maior disponibilidade de GlnK ligada a 2OG e ATP, que é capaz de ativar NifA.

Uma observação pertinente é que a uridililação de GlnK não é essencial para a ativação de NifA, mas a ligação a efetores o é.

#### 4.5. CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *glnK* DE *H. seropedicae*

O plasmídeo pEMB200 foi usado como DNA molde para uma reação de PCR de baixa fidelidade empregando os primers T7F grd e T7term grd. O produto de PCR foi digerido com as enzimas XbaI e BamHI, e ligado ao MCSI do plasmídeo HsglnKDNifA cortado com as mesmas enzimas. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22, e plaqueado em LA contendo cloranfenicol e ampicilina. As colônias resultantes foram riscadas em LA contendo cloranfenicol, ampicilina, Xgal, e 5 μM IPTG. Colônias brancas ou azul-claras foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos e para avaliação da atividade de β-galactosidase. Os plasmídeos foram seqüenciados com o primer DuetDOWN1 e DuetUP2.

Dentre as 1050 colônias riscadas, foram obtidos dezesseis clones que atendiam aos critérios de seleção. O seqüenciamento deles revelou a presença de mutações diferentes em cada um deles, conforme sumarizado na tabela abaixo:

TABELA 9 – VARIANTES DO GENE *glnK* OBTIDAS POR MUTAGÊNESE ALEATÓRIA

Clone	mutação no gene <i>glnK</i>	alteração na proteína	Fenótipo
1	C79T, C243T	P10L	Branca
2	deleção a partir da base 302	Truncagem a partir do resíduo 103, fusão a um peptídeo do vetor	Branca
3	A263G	D88G	Branca
4	A224G	E75G	Azul clara
5	A4G	K2E	Branca
6	Sem mutação	Sem mutação	Branca
7	G104A	G35D	Branca
8	T11C, G251A	I4T, G84D	Branca
9	Não seqüenciado		Branca
10	T8C	L3P	Branca
11	Deleção C171	Mudança de fase a partir do resíduo 57	Branca
12	G103A	G35S	Branca
13	MCSI vazio		Branca
14	T11C, T162C	I4L	Branca
15	Sem mutação	Sem mutação	Branca
16	A1G	M1V	Azul clara

A capacidade de essas variantes de GlnK ativarem NifA foi avaliada em *E. coli* JM109(ΔDE3) com pRT22, conforme descrito em 3.9. Os resultados são mostrados no gráfico abaixo:

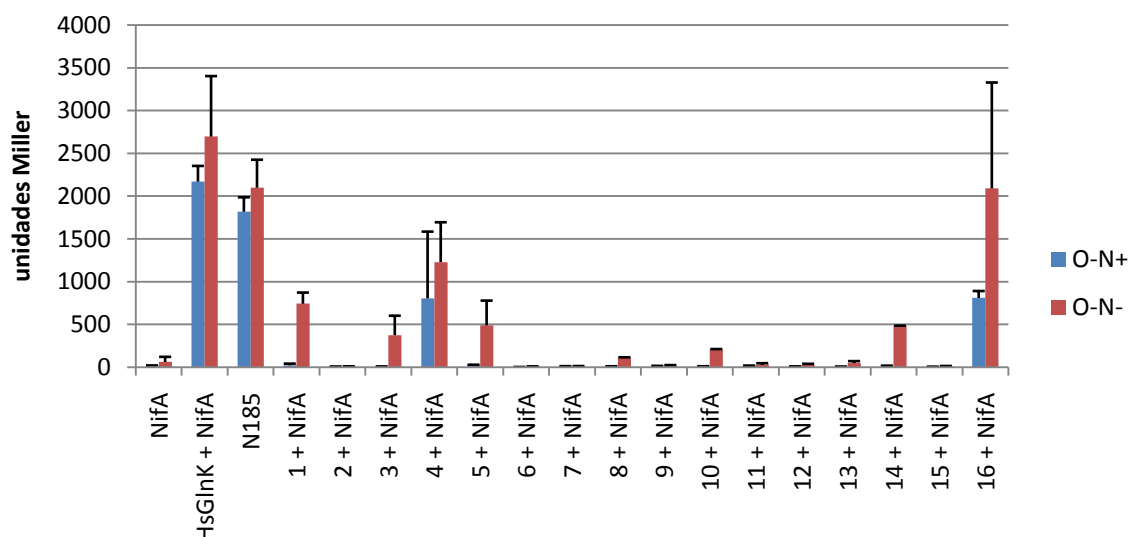


FIGURA 18 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109(λDE3) EXPRESSANDO NIF A E DIFERENTES MUTANTES PONTUAIS ALEATÓRIOS DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae*. A avaliação da atividade de β-galactosidase foi feita na presença de 5 μM de IPTG com 0 ou 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl.

Note-se que a maioria dos clones (2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15) produziu proteínas que foram incapazes de ativar NifA nas condições testadas. Destes, ao menos um deles (13) corresponde a um plasmídeo com o MCSI vazio, compreensivelmente sem atividade; dois deles (2 e 11) possuem mutações que levam a alterações drásticas na cadeia protéica de GlnK, provocadas por mudanças de fase de leitura. Dois desses plasmídeos codificam proteínas GlnK sem mutações: o clone 15 possui uma deleção na base g607 do gene *NifA*, que leva a uma mudança de fase; não foi identificada mutação nos genes do clone 2, porém, e portanto sua falta de atividade permanece sem explicação por enquanto. Um clone (9) não foi seqüenciado corretamente. Os restantes (7, 8, 10, 12, e 14) possuem mutações que alteram resíduos bastante conservados, que possivelmente são vitais para a estrutura e função de PII.

Dois clones (4 e 16) codificam proteínas PII cuja capacidade de ativar NifA não é regulada nesse sistema de expressão, tal qual as proteínas PII selvagens. A mutação a1g do clone 16 é provavelmente inócua, possivelmente diminuindo ligeiramente seu nível de expressão, e essa proteína tem atividade semelhante a GlnK selvagem. A mutação que gera E75G no clone 4, porém, altera um resíduo conservado entre as diversas proteínas PII; esse resíduo parece não ser essencial para a atividade de PII, mas sua mutação diminuiu a capacidade da proteína de ativar NifA.

Por fim, três clones (1, 3, e 5) codificam proteínas PII capazes de ativar NifA parcialmente quando em baixa concentração de NH<sub>4</sub>Cl, mas não em altas concentrações desse sal. Esse fenótipo é semelhante ao do mutante Y51F de GlnK, que não é uridililável.

Um ensaio de β-galactosidase realizado com superexpressão dos mutantes mais interessantes (1, 3, 4, 5, 8, 10, 14) resultou em perfis de ativação diferentes dos de Y51F:

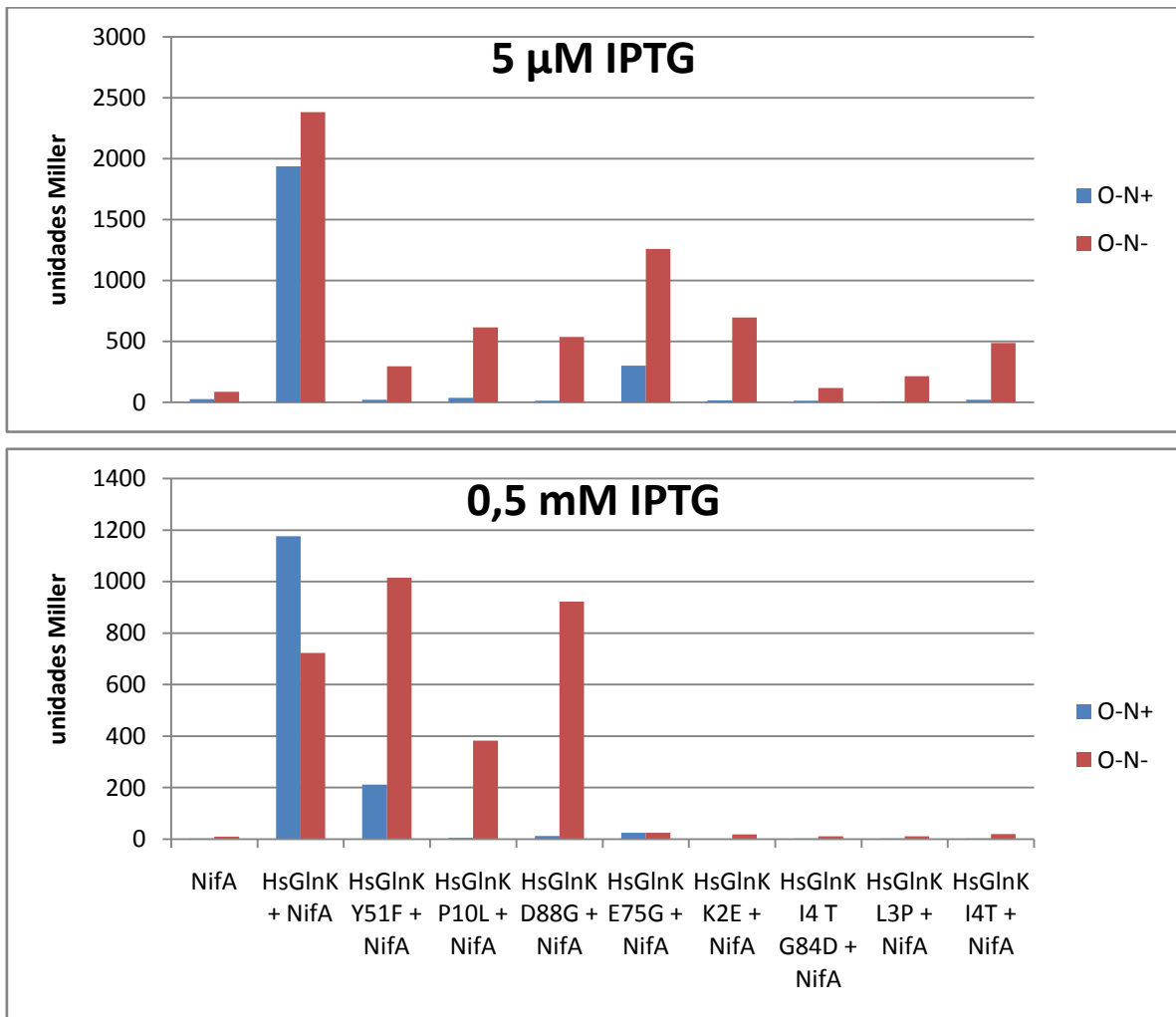


FIGURA 19 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109(λDE3) EXPRESSANDO NIFA E ALGUNS MUTANTES PONTUAIS ALEATÓRIOS DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES DE IPTG. A avaliação da atividade de β-galactosidase foi feita na presença de 0 ou 20 MM de NH<sub>4</sub>Cl.

Essas proteínas foram corretamente expressas, conforme visto por SDS-PAGE das amostras do ensaio com superexpressão das proteínas:

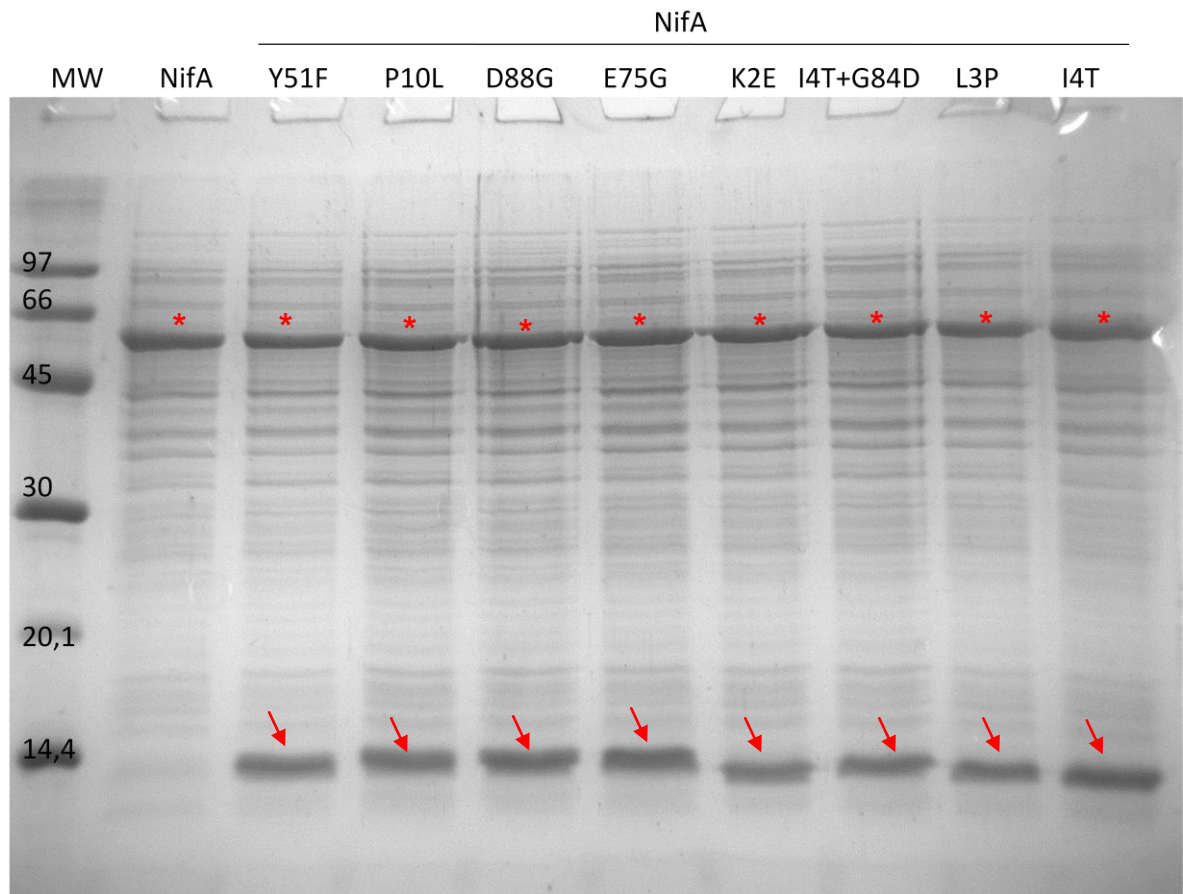


FIGURA 20 – ELETROFORESE DE EXTRATOS DE *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO NIFA E MUTANTES PONTUAIS DE GlnK DE *H. seropedicae* EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE. As proteínas PII estão indicadas por uma seta; as proteínas NifA estão indicadas por um asterisco. MW, marcador de massa molecular (kDa). As mutações listadas no topo de cada linha se referem à proteína GlnK.

Os resíduos mutagenizados foram localizados na estrutura de proteína GlnZ de *A. brasilense*. Isso está mostrado na figura abaixo. As mutações que aboliram a ativação de NifA por GlnK estão marcadas em ciano; aquelas que diminuíram a atividade de NifA estão marcadas em magenta; e aquelas que diminuíram bastante a atividade (em especial em altas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) estão marcadas em verde.

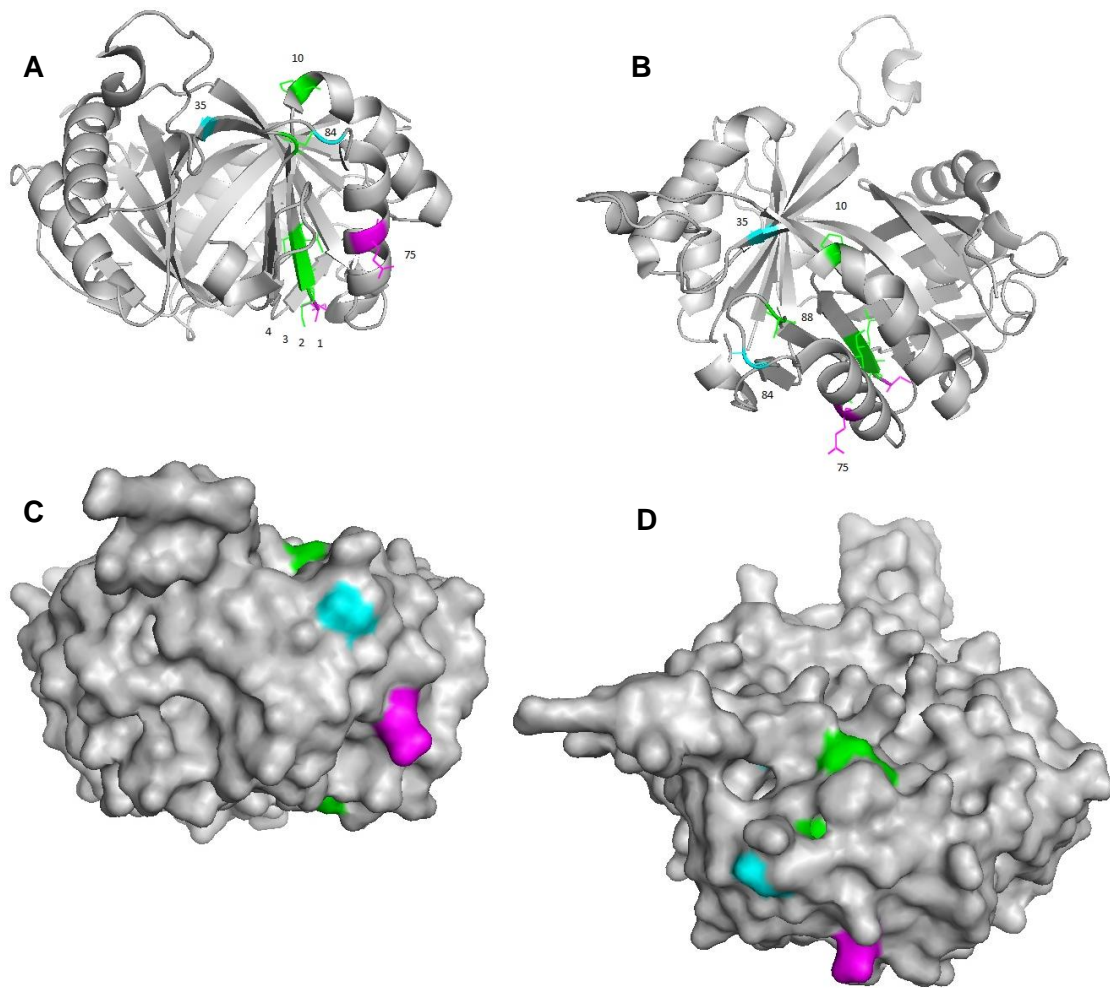


FIGURA 21 – MODELO DE GlnZ DE *A. brasilense*, COM OS RESÍDUOS MUTAGENISADOS ALEATORIAMENTE MARCADOS COM CORES DIFERENTES. Ciano, mutações que aboliram a ativação de NifA por GlnK; magenta, mutações que diminuiram a ativação de NifA; verde, mutações que diminuiram bastante a ativação de NifA em altas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . (A) Vista lateral, destacando a localização dos resíduos 1, 2, 3, 4, 10, 35, 75, e 84. (B) Vista de uma parte da lateral e da face do T-loop, destacando a localização dos resíduos 10, 35, 75, 84, e 88. (C) Vista lateral em modelo de preenchimento espacial. (D) Vista de uma parte da lateral e da face do T-loop em modelo de preenchimento espacial.

Os resíduos 35 e 84 são muito conservados, e sua substituição impediu que GlnK ativasse NifA. G35 está bastante próximo do início do T-loop, e muito próximo ao sítio de ligação aos efetores de PII; é possível que a perda de flexibilidade nessa região (devida à substituição por S ou E) tenha levado a alterações conformacionais que desestremem a proteína ou abolem sua capacidade de ligar efetores. Ainda, G35 parece ser importante para a interação com a ribose de ATP/ADP (XU *et al.*, 1998). O mesmo se pode dizer da mutação G84D, que pode levar à perda de flexibilidade no B-loop, outra região importante para a interação com os efetores. Em PII, G84 é o primeiro resíduo do motivo GXXGXGK (Walker A), que está presente em diversas proteínas que ligam nucleotídeos (RADCHENKO e MERRICK, 2011), 1998). A figura 22 mostra a localização desses e de outros resíduos próximos no sítio de ligação a efetores de PII:

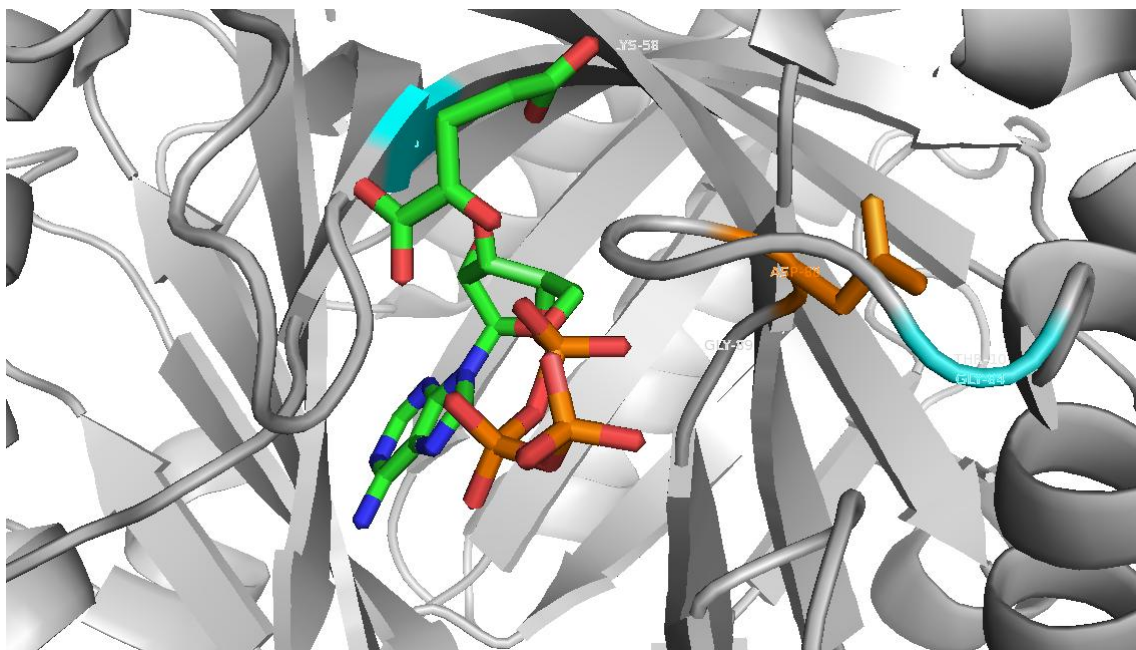


FIGURA 22 – MODELO DE GlnZ DE *A. brasilense*, MOSTRANDO A REGIÃO DE LIGAÇÃO A ATP/ADP E 2OG, COM OS RESÍDUOS MUTAGENISADOS MARCADOS COM CORES DIFERENTES. Ciano, à esquerda, G35; ciano, à direita, G84; laranja, D88.

A substituição D88G, por outro lado, também ocorre no B-loop, mas não abole completamente a capacidade de GlnK ativar NifA. Muito provavelmente, porém, altera a afinidade pelos efetores de PII. Uma diminuição na afinidade pelos efetores poderia explicar porque essa mutação confere um fenótipo semelhante ao da mutação Y51F (não-uridililável): a uridililação de PII exige sua interação com ATP e 2OG para ocorrer.

A substituição dos resíduos 1 e 75 apenas reduziu a atividade de GlnK; os possíveis efeitos da mutação do resíduo 1 já foram discutidos anteriormente nesta seção. A substituição E75G, também conservado, requer outra explicação. Esse resíduo conservado faz parte de uma  $\alpha$ -hélice, e sua substituição por glicina pode ter desestabilizado a estrutura secundária dessa região. Alternativamente, esse resíduo pode estar localizado na face de PII que interage com NifA, e neste caso sua substituição poderia representar uma diminuição na capacidade de interagir com NifA.

As substituições nos resíduos 2, 3, e 4 são de difícil compreensão. Esses resíduos não estão expostos na superfície de PII, portanto é pouco provável que estejam envolvidos diretamente na interação com NifA. Sua mutação não inativa completamente GlnK, mas diminui sensivelmente sua capacidade de ativar NifA. O mais provável é que essas mutações desestabilizem a estrutura de PII como um todo, uma vez que o resíduo 3 participa de interações entre os monômeros (XU *et al.*, 1998), e os demais estão próximos a ele. Alternativamente, também poderiam alterar a afinidade por ATP/ADP; essas mutações poderiam afetar o posicionamento do resíduo adjacente 17, que é importante para a interação de PII com a ribose de ATP/ADP (XU *et al.*, 1998).

A substituição P10L afeta um resíduo de superfície. A mutação desse resíduo, porém, pode afetar a ligação de 2OG. P10 está localizado próximo de K58 (resíduo essencial para a interação com 2OG), e sua cadeia lateral parece interagir com ele (vide figura 23 abaixo). A substituição desse resíduo poderia acarretar em mudanças na afinidade por 2OG.

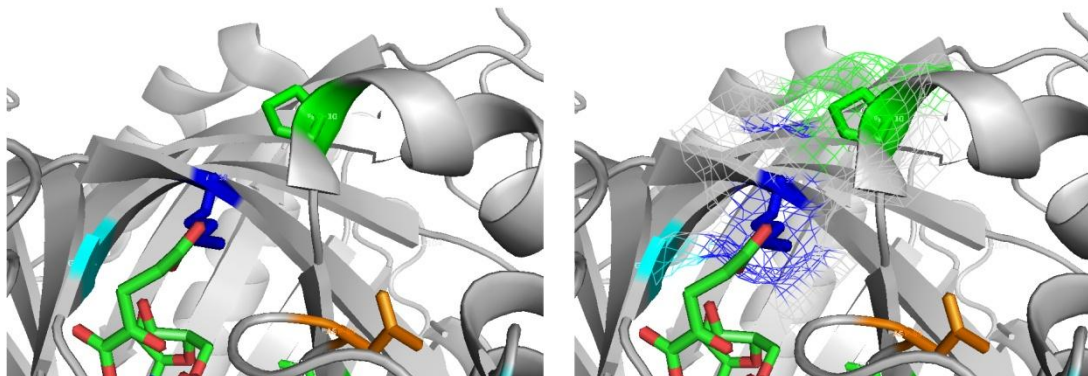


FIGURA 23 – MODELO DE GlnZ DE *A. brasilense*, COM OS RESÍDUOS DA REGIÃO DE INTERAÇÃO COM 2OG MUTAGENISADOS MARCADOS COM CORES DIFERENTES. Azul, K58; verde, P10.

De forma geral, os mutantes de GlnK obtidos por mutagênese aleatória não permitem, neste estágio do trabalho, identificar resíduos importantes para a interação de NifA e GlnK. A maioria das mutações parece afetar ou a estrutura geral de GlnK ou sua capacidade de ligação a efetores; neste último caso, o efeito seria ter proteínas GlnK constantemente em uma conformação que sinaliza alta concentração de nitrogênio, e que não é capaz de ativar NifA.

A dificuldade em interpretar o significado biológico dessas mutações é parecida com a encontrada por Zhu e colaboradores (2006) quando efetuaram mutagênese aleatória de GlnB de *R. rubrum* em busca de variantes de GlnB que ativassem NifA independente de seu estado de uridililação; muitas mutações foram encontradas em várias regiões da proteína, e essas mutações levavam à ativação constante de NifA e diminuição da interação entre GlnB mutagenizada e NtrB. Os autores propuseram que as mutações encontradas alteravam a conformação de PII de modo a torná-la sempre parecida com a conformação adotada em baixas concentrações de nitrogênio.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE VARIANTES DA PROTEÍNA NifA COEXPRESSAS COM GlnK

Experimentos anteriores com variantes N-truncadas de NifA mostraram que a remoção dos primeiros 45 resíduos de aminoácidos de NifA leva à perda de atividade dessa proteína em *H. seropedicae*; e a remoção dos primeiros 165 aminoácidos gera uma proteína

NifA não regulada, e ativa em *E. coli* (STEFANELLO, 2011). Para avaliar a capacidade de GlnK de ativar essas variantes de NifA, ambas foram coexpressas em *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) contendo pRT22 para determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, conforme já descrito.

#### 4.6.1. Subclonagem de variantes do gene *NifA* em DHsglnK

Os plasmídeos pETN45, pETN90, pETN135, pETN165, pETN185, pETN218, e pETN244 foram digeridos com as enzimas XbaI e BamHI, e foram ligados ao plasmídeo DHsglnK cortado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e plaqueada em LA contendo ampicilina. Colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos, que foram digeridos com XbaI/BamHI para a seleção de clones. Os clones que continham os insertos corretos foram denominados hisN45DHsglnK, hisN90DHsglnK, hisN135DHsglnK, hisN165DHsglnK, hisN185DHsglnK, hisN218DHsglnK, hisN244DHsglnK, respectivamente.

#### 4.6.2. Determinação da ativação de variantes de NifA por GlnK

Os plasmídeos pETDuet1, DHsglnK, DNifA, HsglnKDNifA, hisN45DHsglnK, hisN90DHsglnK, hisN135DHsglnK, hisN165DHsglnK, hisN185DHsglnK, hisN218DHsglnK, e hisN244DHsglnK foram transformados em *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pRT22. As bactérias foram então utilizadas em ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados são sumarizados no gráfico abaixo:

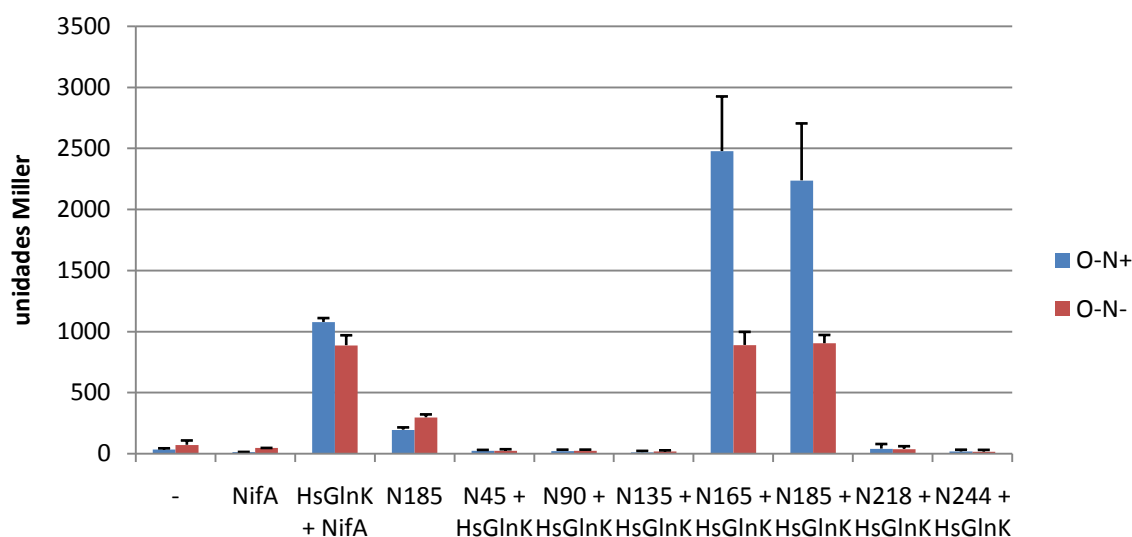


FIGURA 24 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE *E. coli* JM109( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO GlnK E VARIANTES N-TRUNCADAS DE NIFA DE *H. seropedicae*. As células foram cultivadas conforme descrito em 3.9 em alta (+20mM) ou baixa (+0mM) concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , na presença de 0,5mM de IPTG para indução da expressão das proteínas.

Note-se que nenhuma das variantes N45, N90, N135, N218, e N244 não são ativas mesmo durante a co-expressão com GlnK; isso está de acordo com as observações previamente feitas em *H. seropedicae* (STEFANELLO, 2011), e indica que essas proteínas estão permanentemente incapacitadas para a ativação por PII. Uma vez que, no ensaio em *E. coli* expressando as proteínas a partir de pETDuet1, o nível de expressão de ambas as proteínas é semelhante, excluindo a possibilidade de não se ver ativação devido à baixa expressão de um dos peptídeos.

#### 4.7. INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO GAF DE NifA E A PROTEÍNA NifA $\Delta$ GAF

Trabalhos anteriores mostraram que o domínio N-terminal de NifA (GAF) é importante para a inibição da atividade de NifA em *E. coli* (MONTEIRO *et al.*, 1999) e em *H. seropedicae* (NOINDORF *et al.*, 2011), e há evidências de que essa inibição ocorre por interação *in trans* entre o domínio GAF e os domínios Central+C-terminal ( $\Delta$ GAF). O trabalho com a proteína NifA *in vitro* seria importante para elucidar o mecanismo dessa inibição; porém, sempre foi prejudicado pela baixa solubilidade da proteína NifA inteira e pela tendência a agregação que apresentam os seus domínios N-terminal e Central+C-terminal quando expressos independentemente. As seções seguintes descrevem a purificação das proteínas hisN185 ( $\Delta$ GAF; resíduos 186-542 de NifA fundidos a uma cauda de histidinas N-terminal) e G185his (GAF; resíduos 1-185 fundidos a uma cauda de histidinas C-terminal), e sua análise por SDS-PAGE (para determinar o grau de pureza das proteínas) e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC – para determinar a homogeneidade da preparação quanto ao estado de oligomerização), e alguns ensaios de interação entre as duas proteínas.

##### 4.7.1. Purificação de hisN185 ( $\Delta$ GAF)

A purificação de hisN185 foi feita conforme descrito na seção 3.10.4. Utilizou-se uma coluna Hitrap Chelating de 1mL carregada com íons  $\text{Co}^{++}$ , com os quais a cauda de histidinas da proteína interage. A figura abaixo mostra um gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE contendo as frações da purificação.

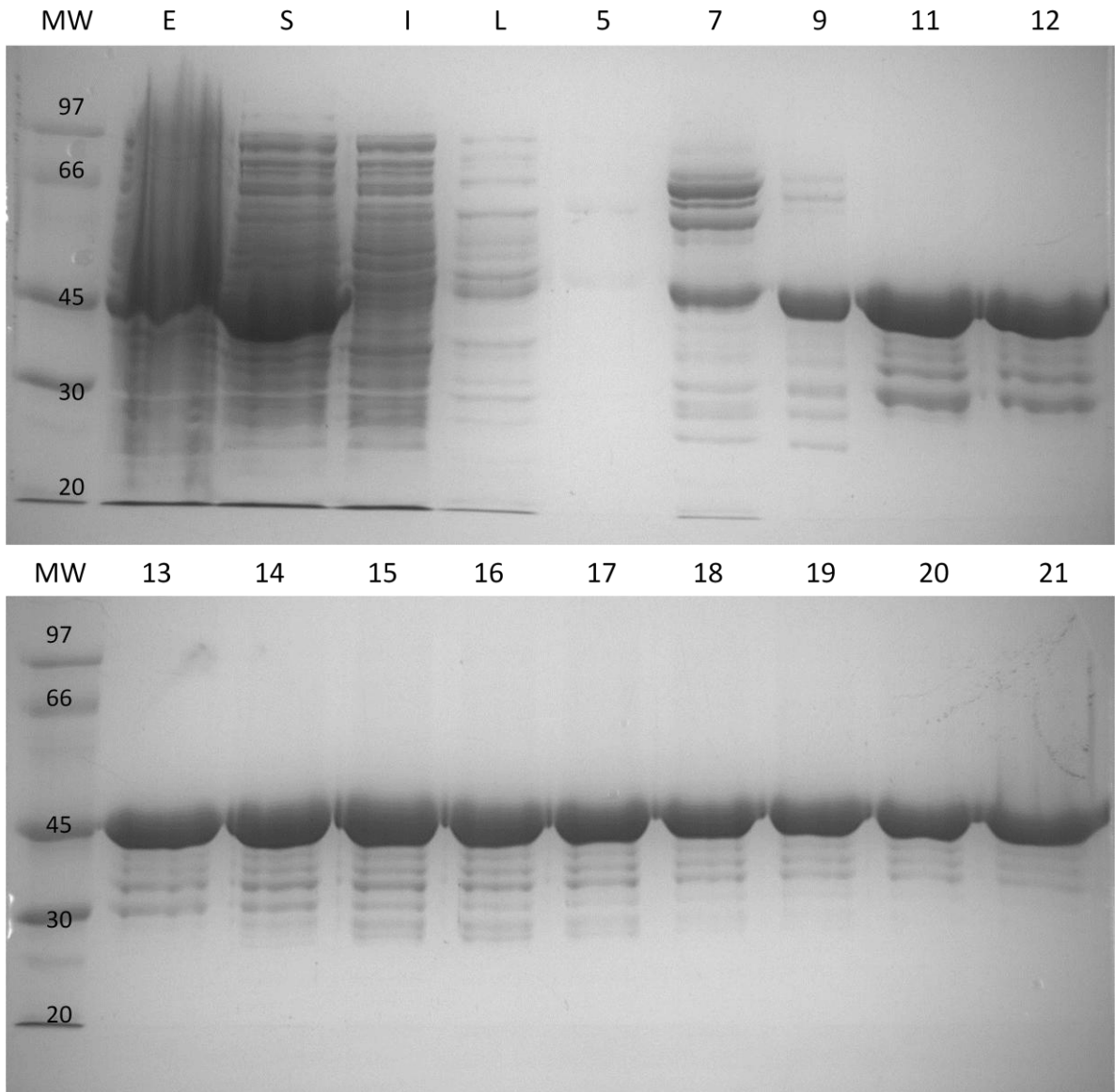


FIGURA 25 – ANÁLISE POR SDS-PAGE DE FRAÇÕES DA PURIFICAÇÃO DE hisN185. MW, marcador de massa molecular (kDa); E, extrato bruto; S, fração solúvel; I, fração que não ligou na coluna; L, fração obtida após a lavagem da coluna. 5-21, frações obtidas durante a eluição.

As frações 13 a 21 foram juntadas e dialisadas contra tampão contendo 50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, e 50% glicerol. Aliquotas de 100  $\mu$ L foram guardadas em  $N_2$  líquido. A concentração final de proteína foi de 1,7 mg/mL (cerca de 40  $\mu$ M do monômero de hisN185).

Para analisar a homogeneidade de hisN185, a proteína hisN185 purificada foi submetida a análise por cromatografia de exclusão de tamanho, conforme descrito na seção 3.10.7. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE; o gel resultante e o cromatograma da análise estão mostrados abaixo:

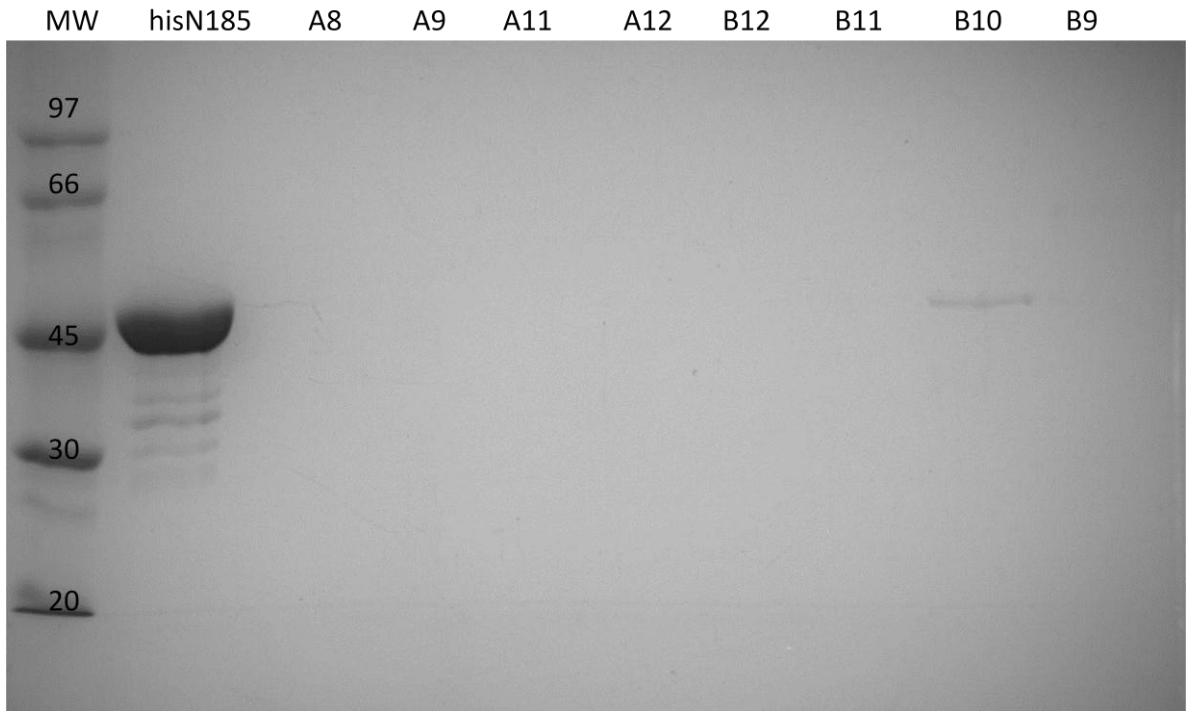


FIGURA 26 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12% DESNATURANTE DE FRAÇÕES DA ANÁLISE DE hisN185 POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO. MW, marcador de massa molecular (kDa); hisN185, proteína purificada antes de ser injetada na coluna de gel filtração; A8-B9, frações coletadas durante a eluição.

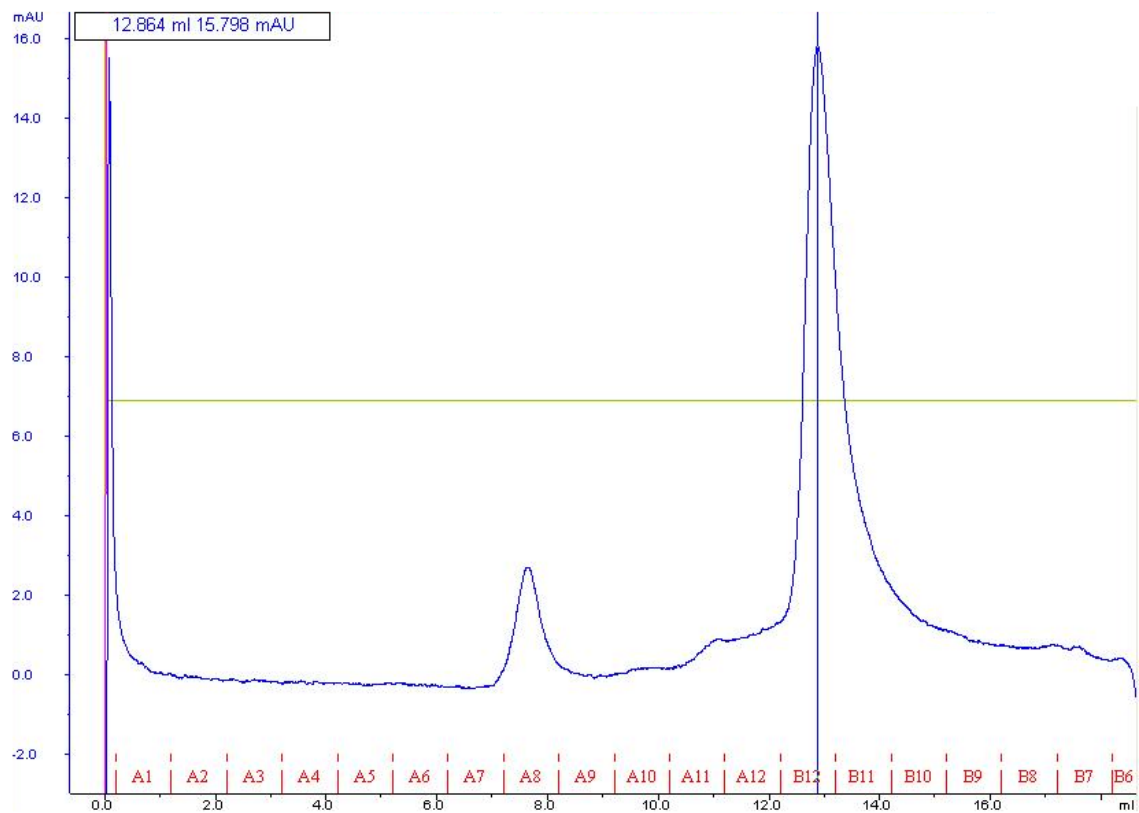


FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE hisN185 POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO.

A calibração da coluna permitiu construir um gráfico correlacionando o tempo de retenção na coluna com o log da massa molar, mostrado abaixo:

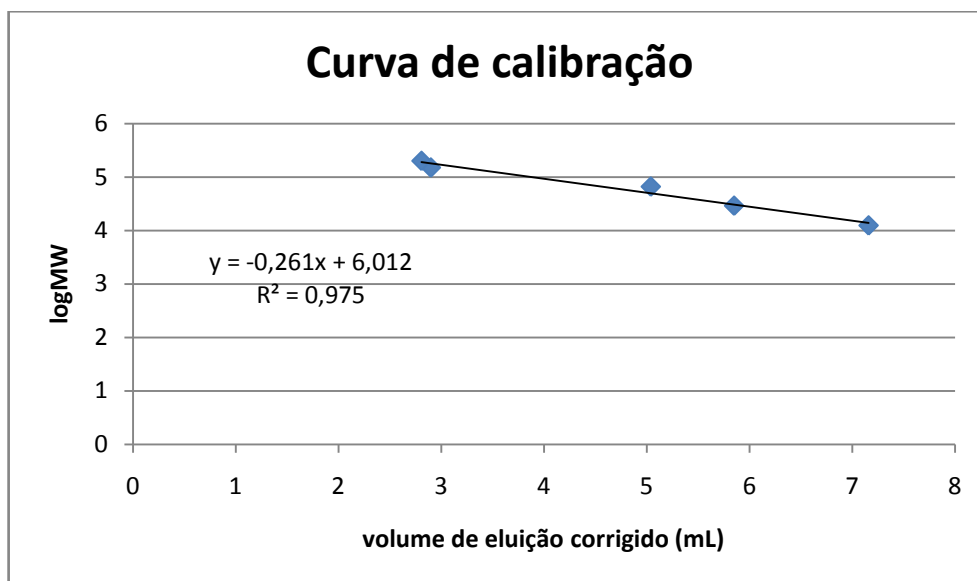


FIGURA 28 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA COLUNA SUPEROSE 12 10/300.

A curva de calibração estipulou que  $\log MW = -0,261 \cdot ve + 6,012$ . A massa molecular da maior parte de hisN185 foi estimada em 43,72 kDa, o que equivale à massa de um monômero de hisN185 (massa do monômero = 42,56 kDa). Uma parcela significativa foi eluída no volume morto, correspondendo a proteínas agregadas e/ou oligômeros de alta massa molecular. A proteína foi, a despeito disso, considerada boa o bastante para os ensaios subseqüentes.

#### 4.7.2. Purificação de G185his

A purificação de G185his foi feita conforme descrito na seção 3.10.5. Utilizou-se inicialmente duas colunas Hitrap QFF de 1mL in tandem, para reter alguns contaminantes; em seqüência, utilizou-se uma coluna Hitrap Chelating de 1mL carregada com íons  $Co^{++}$ , que interagem bem com a cauda de histidinas da proteína. A figura abaixo mostra um gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE contendo as frações da primeira etapa de purificação.

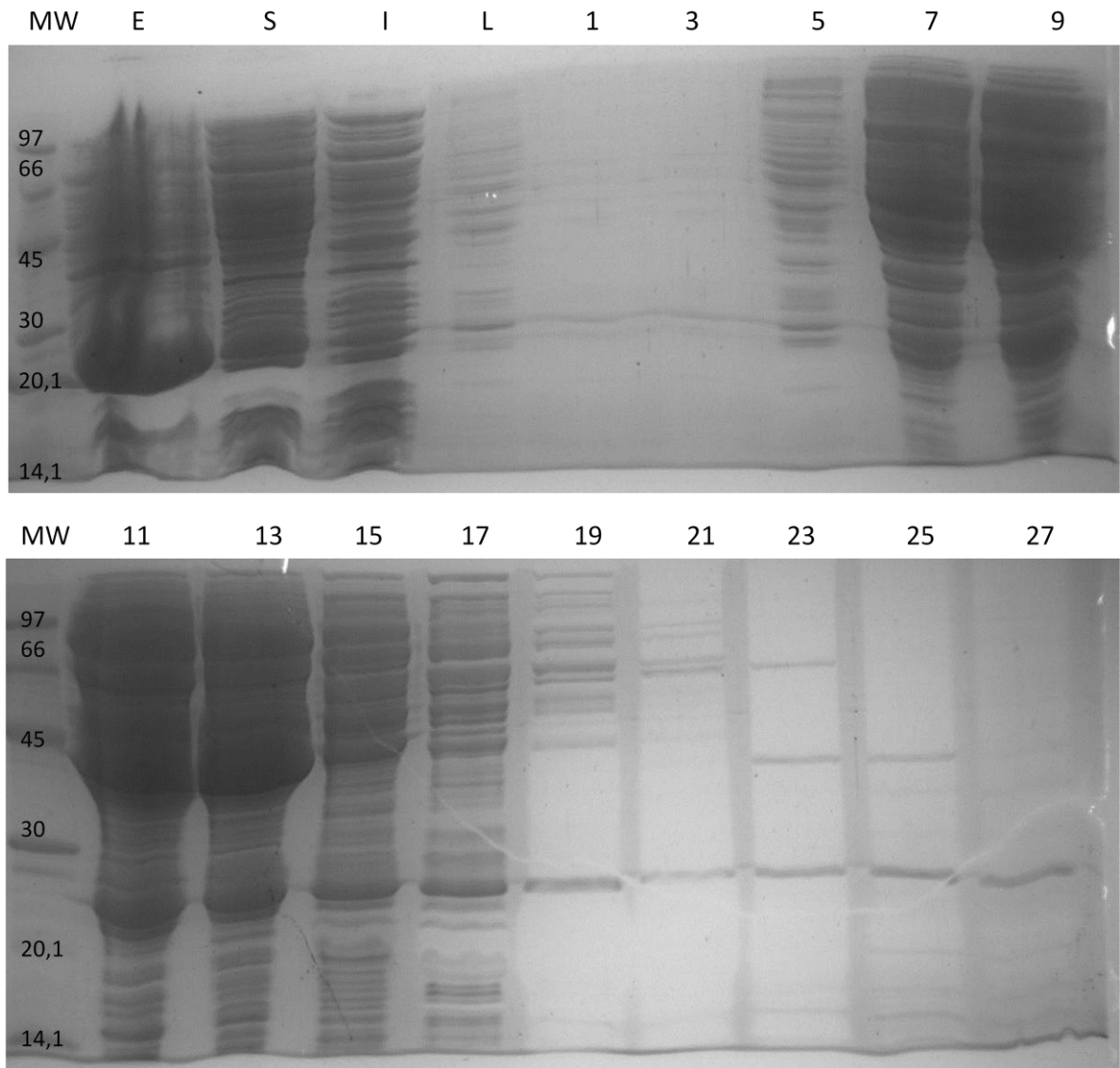


FIGURA 29 – ANÁLISE SDS-PAGE DE FRAÇÕES DA PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DE G185his. E, extrato bruto; S, fração solúvel; I, fração que não ligou na coluna; L, fração obtida após a lavagem da coluna. 1-27, frações obtidas durante a eluição.

As frações 9 a 17 foram juntadas e usadas na segunda etapa de purificação, cujas frações estão mostradas no gel abaixo:

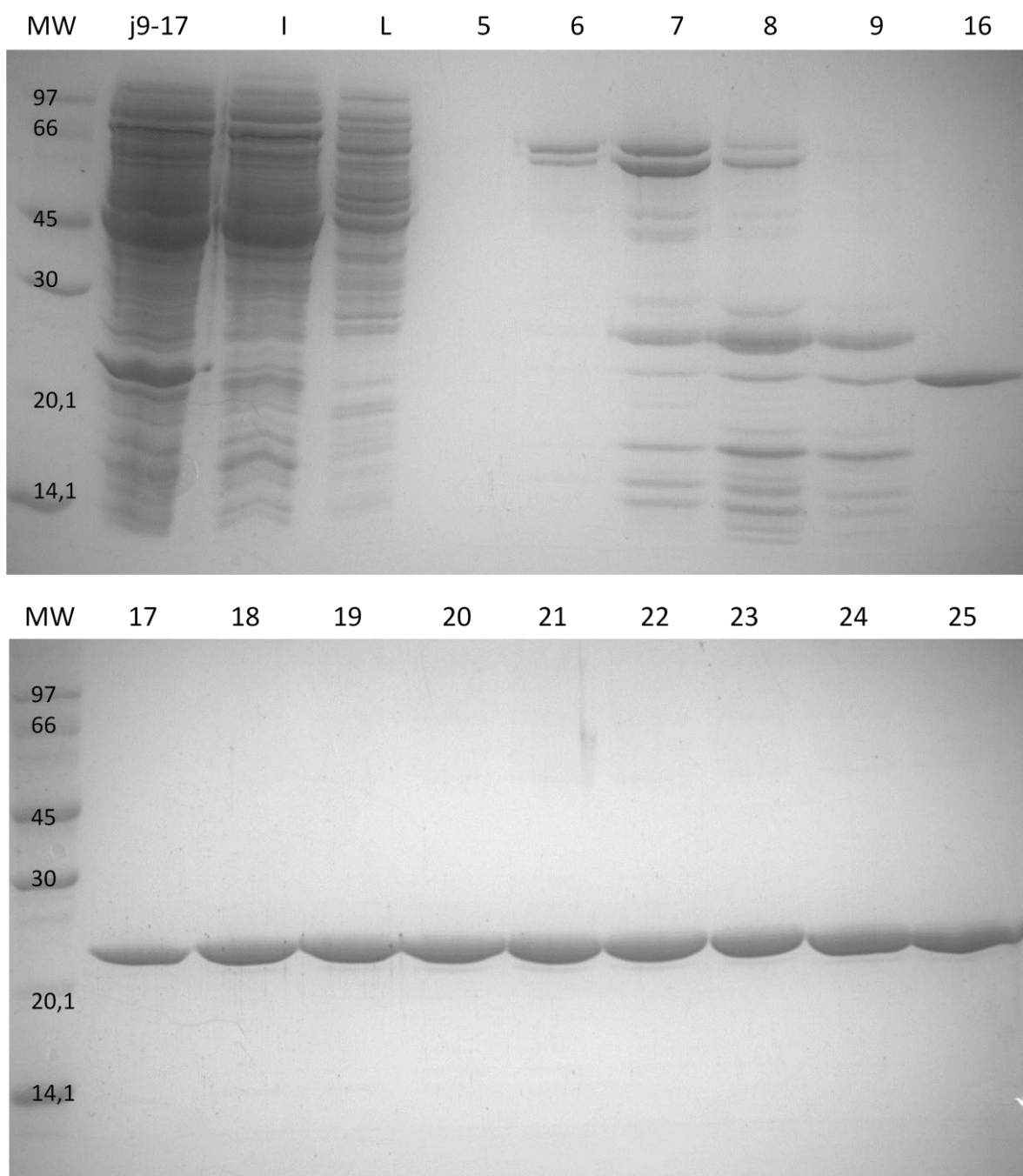


FIGURA 30 – ANÁLISE SDS-PAGE DE FRAÇÕES DA SEGUNDA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DE G185his. MW, marcador de massa molecular (kDa); j9-17, frações 9 a 17 da primeira etapa de purificação (vide figura 29); I, fração que não ligou na coluna; L, fração obtida após a lavagem da coluna. 5-25, frações obtidas durante a eluição.

As frações 16 a 25 foram juntadas, e dialisadas contra tampão contendo 50 mM HEPES Ph 8,0, 500 mM NaCl, e 50% glicerol. Após isso, a amostra foi centrifugada para remoção de proteínas precipitadas. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram guardadas em  $N_2$  líquido. A concentração final de proteína foi de 0,16 mg/mL (cerca de 7  $\mu$ M do monômero de G185his)

Para analisar sua homogeneidade, a proteína G185his purificada foi submetida a análise por cromatografia de exclusão de tamanho, conforme descrito na seção 3.10.7. As

frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE; o gel resultante e o cromatograma da análise estão mostrados abaixo:

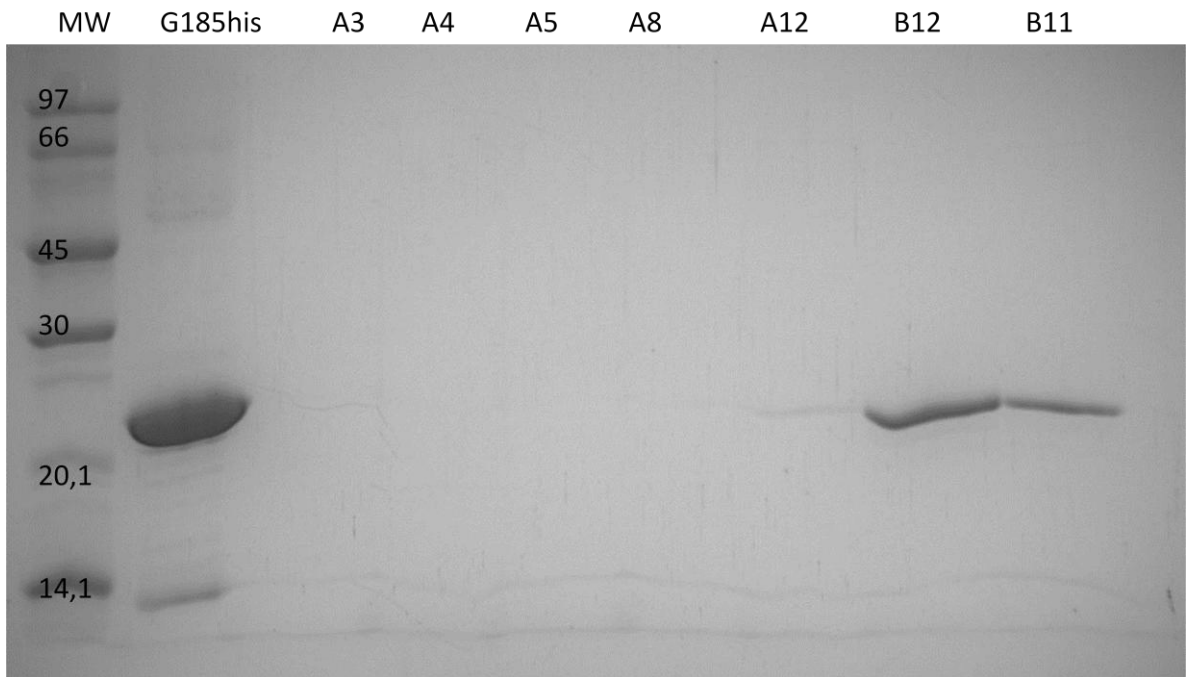


FIGURA 31 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE DE FRAÇÕES DA ANÁLISE DE G185his POR CROMATOGRÁFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO. MW, marcador de massa molecular (kDa); G185his, proteína purificada antes de ser injetada na coluna de gel filtração; A3-B11, frações coletadas durante a eluição.

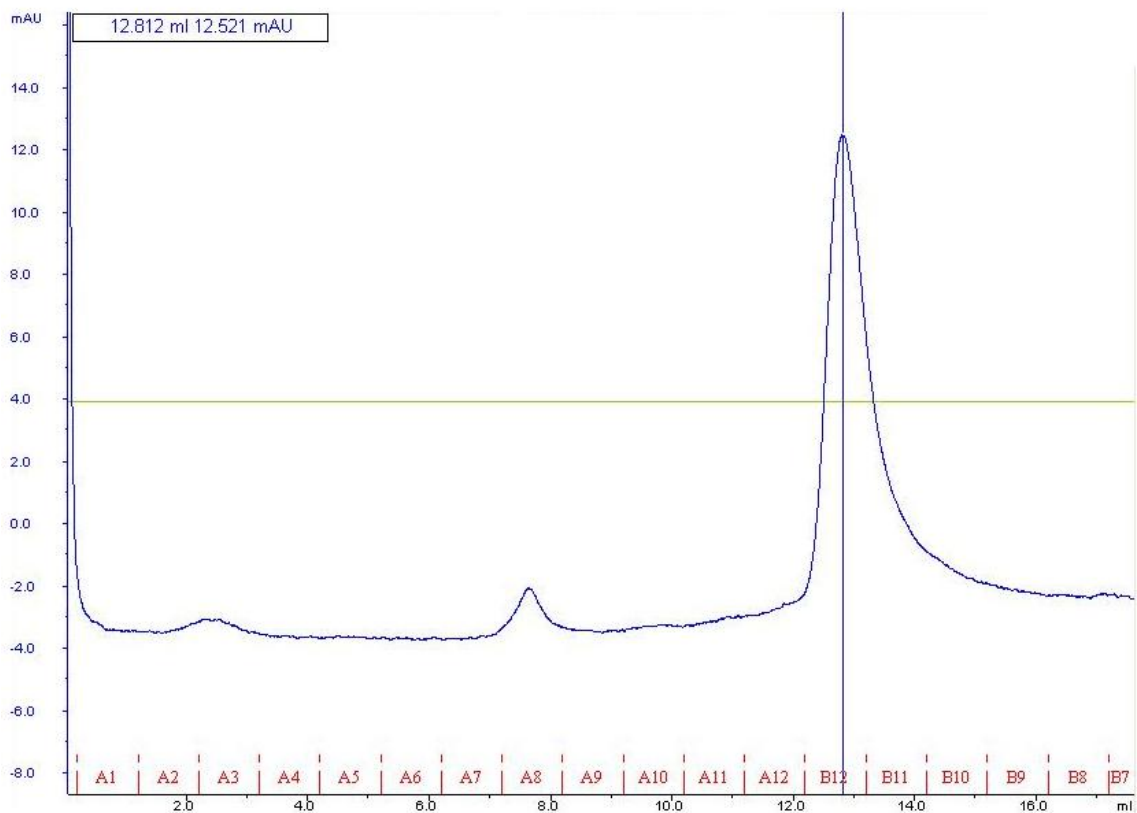


FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE G185his POR CROMATOGRÁFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO.

A massa molar calculada para a maior parte de G185his foi 45,11 kDa, o que equivale à massa de um dímero de G185his (monômero = 22,88 kDa). Uma parcela foi eluída no volume morto, correspondendo a proteínas agregadas e/ou oligômeros de alta massa molecular. A predominância da forma dimérica sugere que a proteína está bem estruturada (caso não estivesse, não seria de esperar que tivesse uma estrutura quaternária bem definida). Além disso, essa estrutura dimérica do domínio GAF também foi encontrada por Batchelor e colaboradores (2013) para ativadores transcricionais dependentes de  $\sigma^{54}$ .

#### 4.7.3. Detecção da interação entre G185his e hisN185 por cromatografia de exclusão de tamanho

Uma mistura de 3  $\mu$ M de G185his e 3  $\mu$ M de hisN185 analisada por cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna Superose 12 10/300 (GE Healthcare), conforme descrito em 3.10.7. Observou-se um aumento do pico do volume morto em relação à injeção de 3  $\mu$ M de G185his ou 3  $\mu$ M de hisN185, conforme mostrado abaixo:

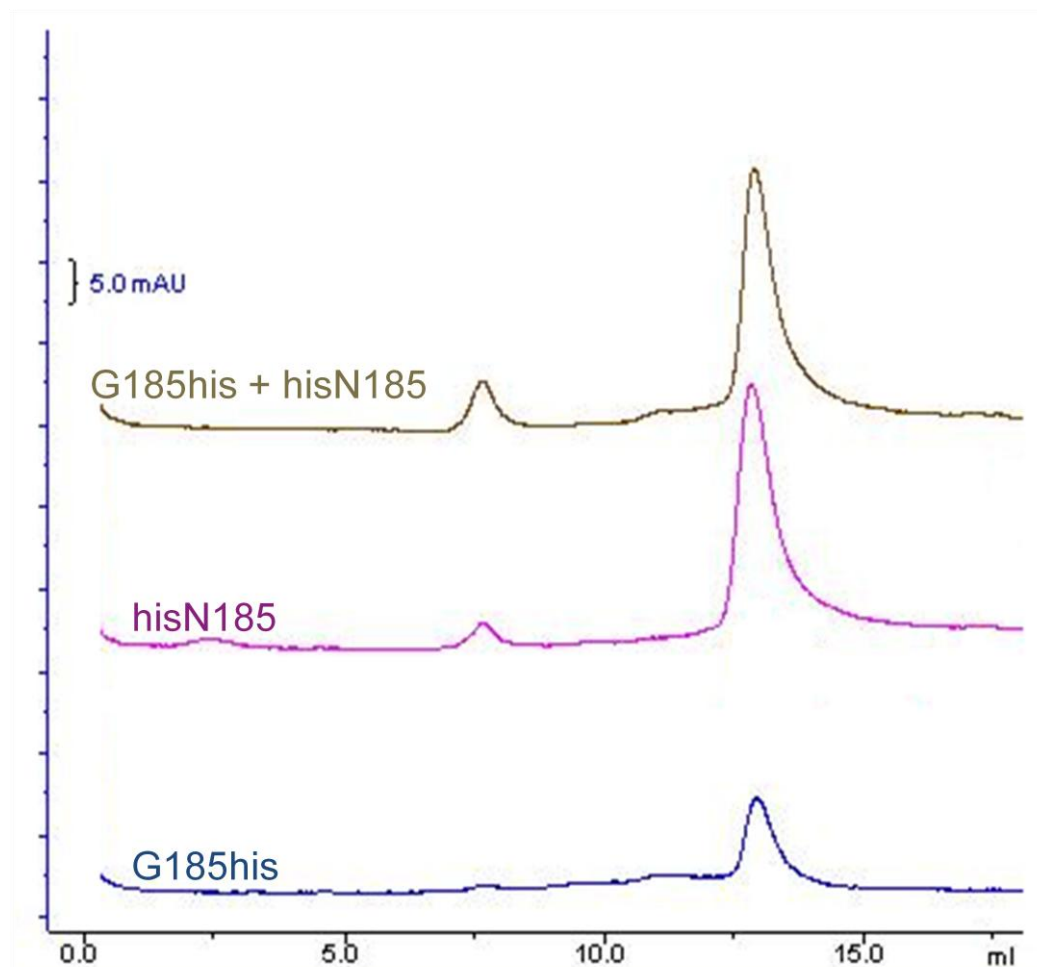


FIGURA 33 - CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE G185his, hisN185, E UMA MISTURA DAS DUAS PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO EM UMA COLUNA DE SUPEROSE 12 10/300.

Não foi detectado, porém, a presença de um pico com massa equivalente de 66 kDa (interação de um monômero de G185his e um monômero de hisN185 – tempo de retenção esperado de 12,15) ou 88 kDa (interação de um dímero de G185his e um monômero de hisN185 – tempo de retenção esperado de 11,65).

#### 4.7.4. Detecção da interação entre G185his e hisN185 por ligação cruzada

Um ensaio de ligação cruzada entre G185his e hisN185 foi realizado com formaldeído, nas condições descritas na seção 3.10.8. O gel abaixo mostra os resultados obtidos com diferentes tempos de incubação:

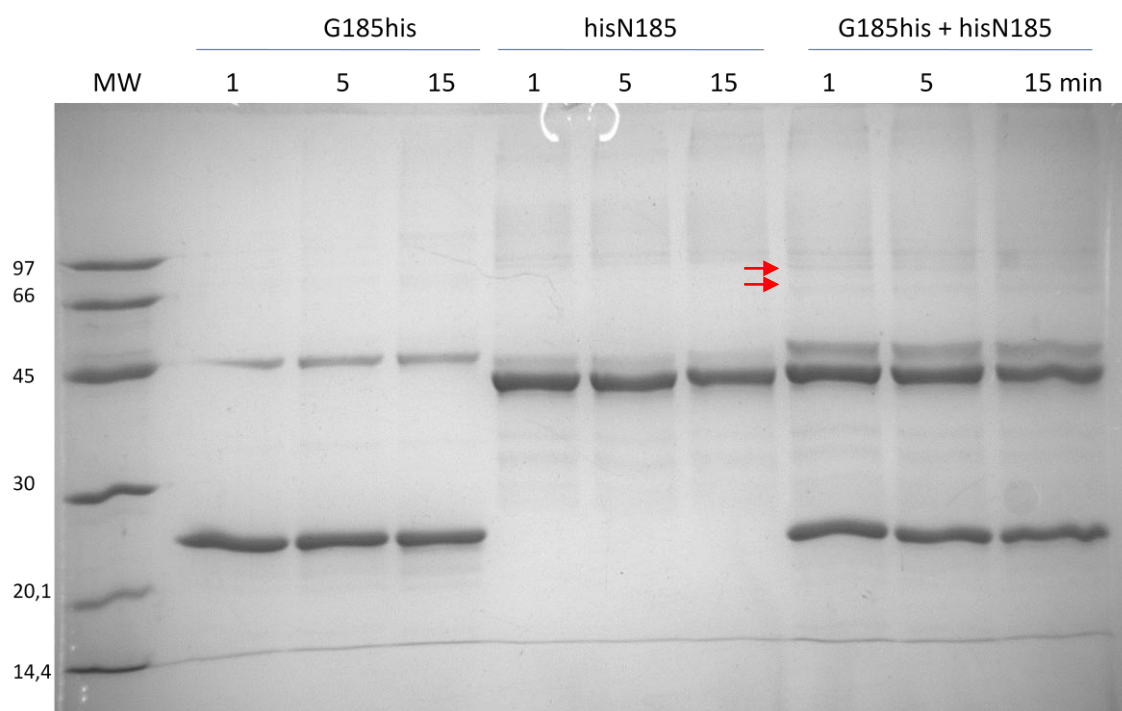


FIGURA 34 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE DE PRODUTOS DE LIGAÇÃO CRUZADA ENTRE G185his E hisN185. Os sistemas continham 4  $\mu$ M de dímero de G185his e 4  $\mu$ M de monômero de hisN185, conforme descrito, e a reação ocorreu por 1, 5, ou 15 minutos, conforme indicado. Bandas detectadas apenas quando as duas proteínas foram incubadas juntas estão marcadas por setas.

Observe-se (1) no sistema de ligação contendo apenas G185his, há formação de uma banda forte com massa de ~45kDa, o que está de acordo com o estado de oligomerização predominante de G185his conforme visto por cromatografia de exclusão de tamanho. Há também a formação de bandas minoritárias com massa  $d > 60$ kDa e  $> 97$ kDa, compatíveis com a ligação de 3 e 4 monômeros de G185his entre si. (2) no sistema de ligação contendo apenas hisN185, há formação de bandas de alto peso molecular, que são indício de oligomerização. (3) no sistema contendo G185his e hisN185, há duas bandas de massa molecular estimada em 66 e  $> 80$  kDa que não estão presentes nos outros sistemas. Essas bandas são compatíveis com a interação entre um monômero de hisN185 e um

monômero de G185his (massa total: 65,44 kDa) ou um dímero de hisN185 (massa total: 88,32 kDa), indicando que há interação entre os domínios de NifA in vitro.

#### 4.8. INTERAÇÃO ENTRE OS DOMÍNIOS DE NifA E GlnK OU GlnK-UMP<sub>3</sub>

Uma vez que as evidências in vivo obtidas neste e em outros trabalhos (NOINDORF *et al.*, 2011) e algumas evidências in vitro (OLIVEIRA *et al.*, 2012) apontam para a ocorrência de interação direta entre NifA de *H. seropedicae* e GlnK, foram realizadas tentativas de visualizar essa interação in vitro, para posteriormente usar esses ensaios para entender a regulação de NifA por GlnK. As proteínas G185his (resíduos 1-185 de NifA acrescidos de uma cauda de histidinas C-terminal) e hisN185 (resíduos 186-542 de NifA com cauda de histidinas N-terminal) utilizadas nos ensaios foram as mesmas cuja purificação foi descrita nos itens 4.7.14.7.1 e 4.7.2.

A proteína GlnK foi purificada conforme descrito em 3.10.6, e a proteína GlnK-UMP foi fornecida pelo Dr. Marco Aurélio Schuller de Oliveira.

##### 4.8.1. Detecção da interação entre os domínios de NifA e GlnK por eletroforese não desnaturante

Inicialmente, realizou-se uma separação das proteínas purificadas em gel de poliacrilamida não desnaturante para verificar a ocorrência de interação entre os domínios de NifA e a proteína GlnK. As proteínas G185his, hisN185, GlnK e GlnK-UMP<sub>3</sub> foram analisadas separadamente e em misturas contendo um (ou ambos) domínio(s) de NifA e GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub>. A eletroforese em gel não denaturante foi feita conforme descrito em 3.10.3. Neste experimento, foram usados sempre 4 µM do monômero de hisN185, 4 µM do dímero de G185his, e 4 µM do trímero de GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub>. Os resultados dos ensaios estão mostrados na figura 35:

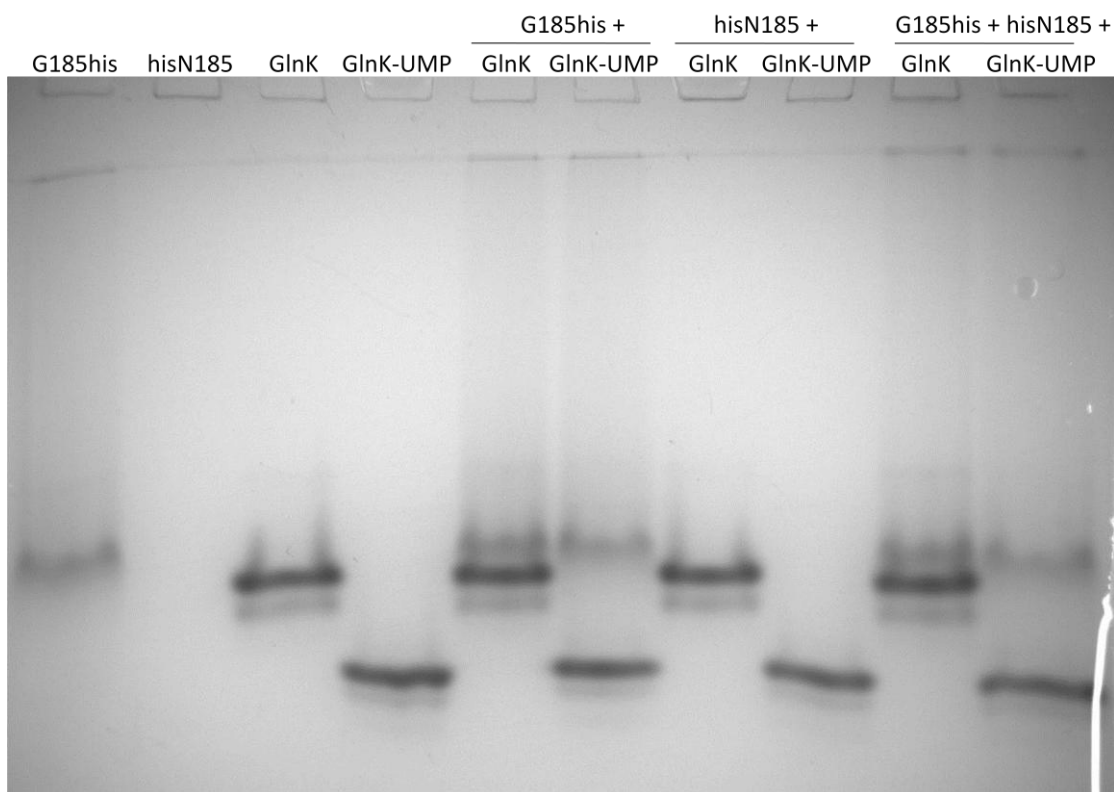


FIGURA 35 – GEL DE ELETROFORESE NÃO DESNATURANTE DE GlnK E DOS DOMÍNIOS DE NIFA. Dez microgramas de monômero de N185his, dímero de G185his, e trímero de GlnK foram adicionados nos sistemas apropriados.

As bandas de G185his, GlnK, e GlnK-UMP<sub>3</sub> apresentam padrões de migração distintos, permitindo sua fácil identificação no gel. Uma parte de G185his, porém, não pôde adentrar o gel, o que é consistente com a presença de oligômeros e/ou agregados que foram detectados durante a análise por cromatografia de exclusão de tamanho (vide figura xxx). A proteína hisN185, por sua vez, não conseguiu adentrar sequer o gel de empilhamento (acrilamida 4%); isso é indicativo de que a proteína agregou totalmente nas condições experimentais. Não fica clara a ocorrência de qualquer tipo de interação entre as proteínas utilizadas.

#### 4.8.2. Detecção da interação entre os domínios de NifA e GlnK por ensaios de pull-down

Para detectar interação entre GlnK e os domínios de NifA, foram conduzidos ensaios de *pull-down* usando as proteínas purificadas, conforme descrito em 3.10.9. Essa abordagem já foi bem-sucedida para a detecção de interação entre NifA e GlnB de *A. brasilense* (SOTOMAIOR *et al.*, 2012). Os ensaios foram feitos usando G185his, hisN185 ou uma mistura de G185his e hisN185 para capturar GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub>. Foram usados sempre 4 µM do monômero de hisN185, 4 µM do dímero de G185his, e 4 µM do trímero de GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub>. Os resultados dos ensaios estão mostrados nas figuras abaixo:

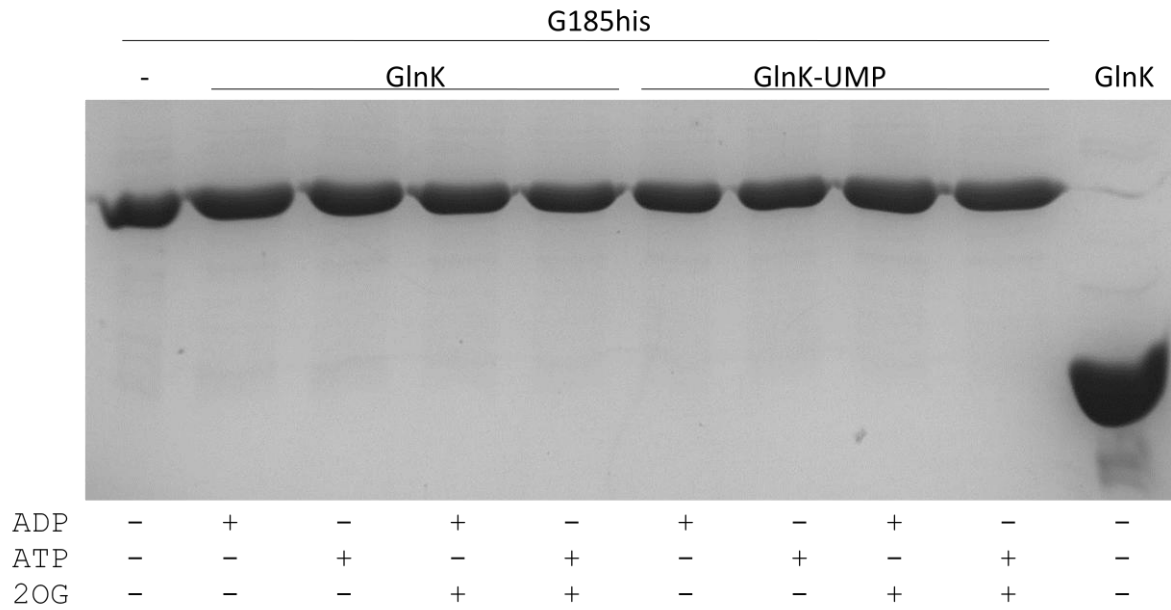


FIGURA 36 – ANÁLISE SDS-PAGE DO ELUATO DOS EXPERIMENTOS DE PULL DOWN USANDO G185his, GlnK, E GlnK-UMP<sub>3</sub>. A última linha contém GlnK, usada como padrão para identificar proteínas com padrão de migração idêntico nas amostras do experimento. Os sinais de + indicam a presença do efetor (3 mM ADP, 3 mM ATP, 2 mM 2OG); os sinais de -, ausência do efetor.

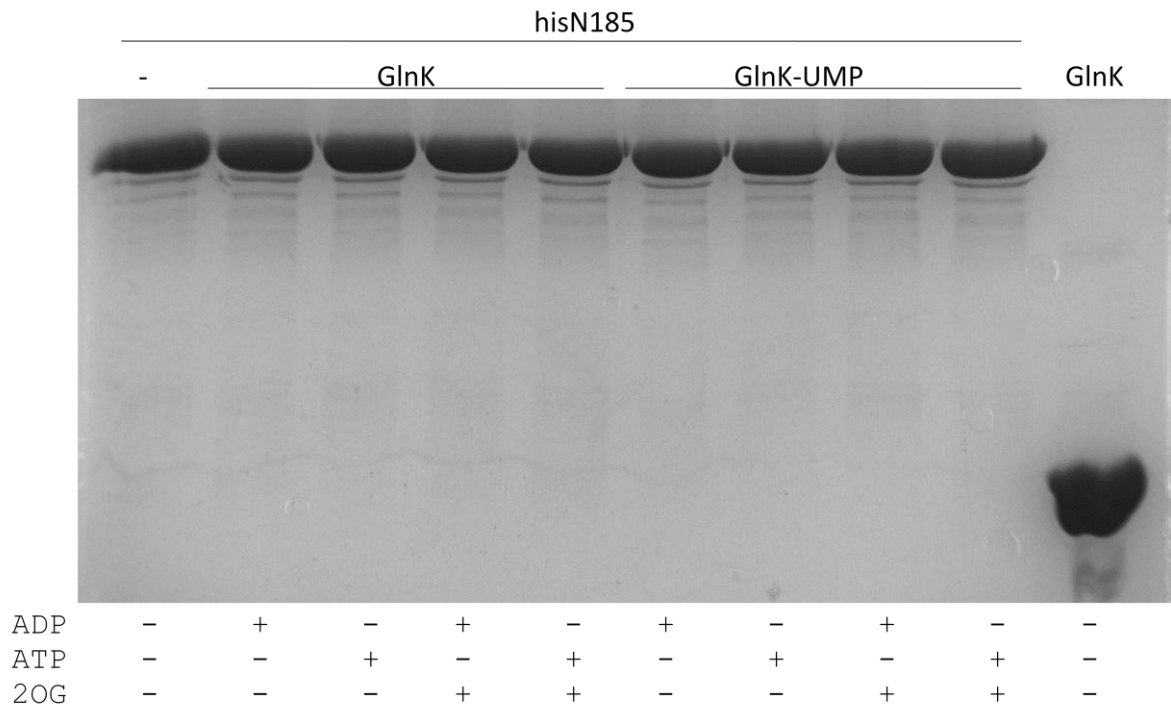


FIGURA 37 – ANÁLISE SDS-PAGE DO ELUATO DOS EXPERIMENTOS DE PULL DOWN USANDO hisN185, GlnK, E GlnK-UMP<sub>3</sub>. A última linha contém GlnK, usada como padrão para identificar proteínas com padrão de migração idêntico nas amostras do experimento. Os sinais de + indicam a presença do efetor (3 mM ADP, 3 mM ATP, 2 mM 2OG); os sinais de -, ausência do efetor.

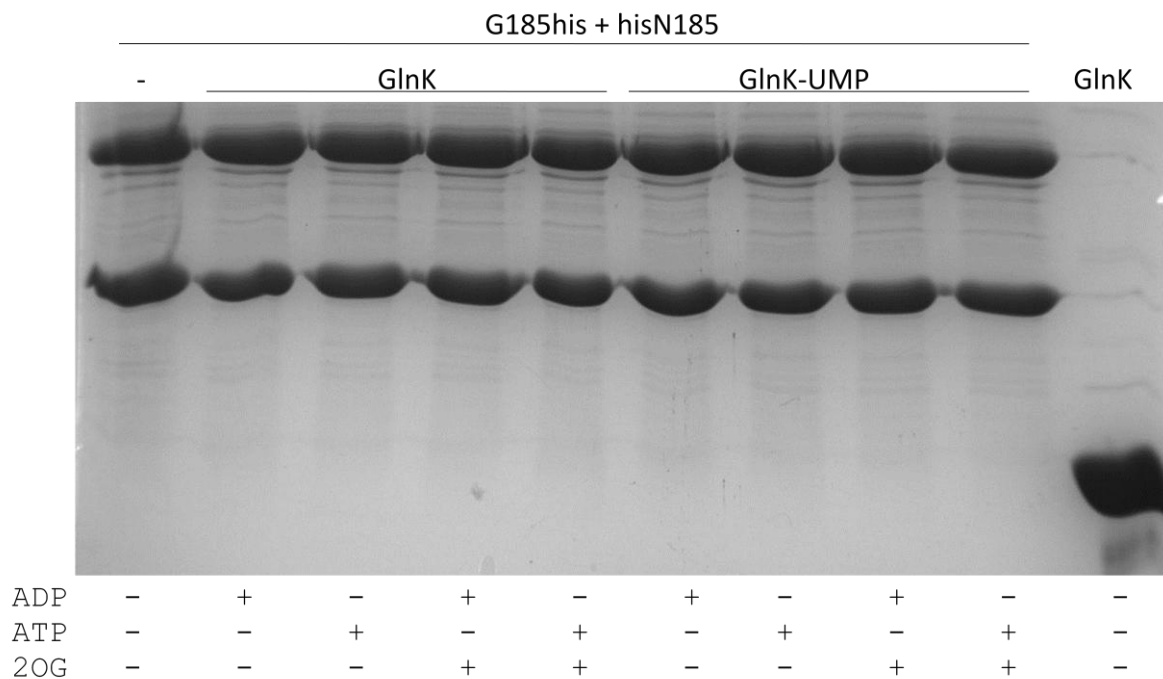


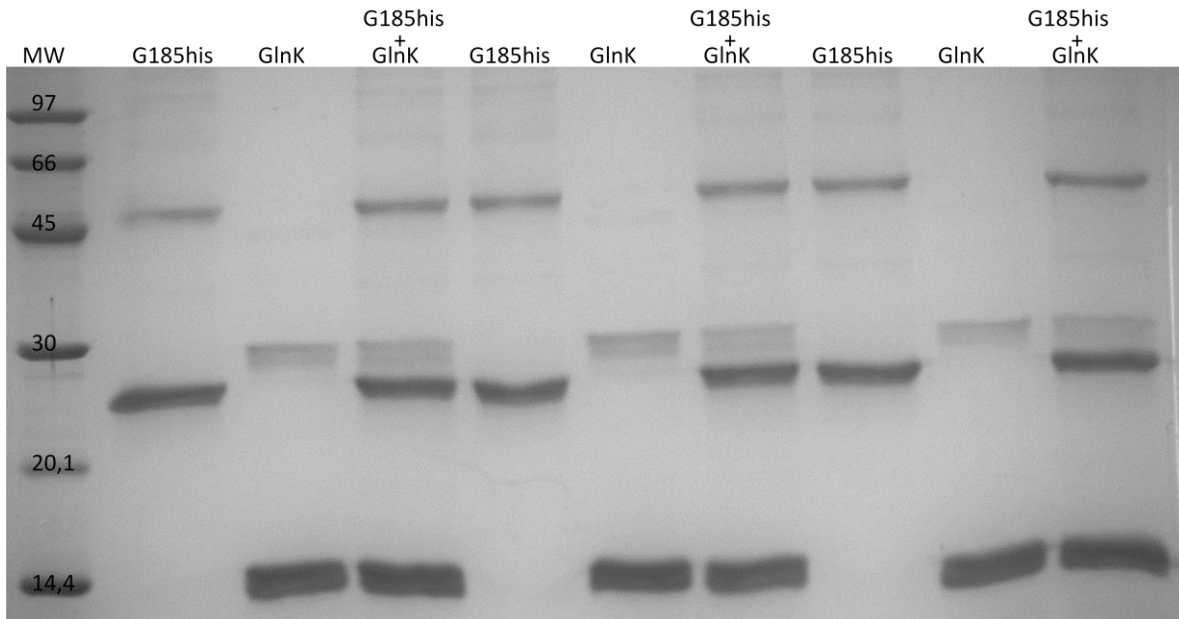
FIGURA 38 – ANÁLISE SDS-PAGE DO ELUATO DOS EXPERIMENTOS DE PULL DOWN USANDO G185his, hisN185, GlnK, E GlnK-UMP<sub>3</sub>. A última linha contém GlnK, usada como padrão para identificar proteínas com padrão de migração idêntico nas amostras do experimento. Os sinais de + indicam a presença do efetor (3 mM ADP, 3 mM ATP, 2 mM 2OG); os sinais de -, ausência do efetor.

Um ensaio usando apenas GlnK e GlnK-UMP<sub>3</sub> (como controle negativo de interação) não acusou interação direta entre PII e a resina MagneHis (dados não mostrados).

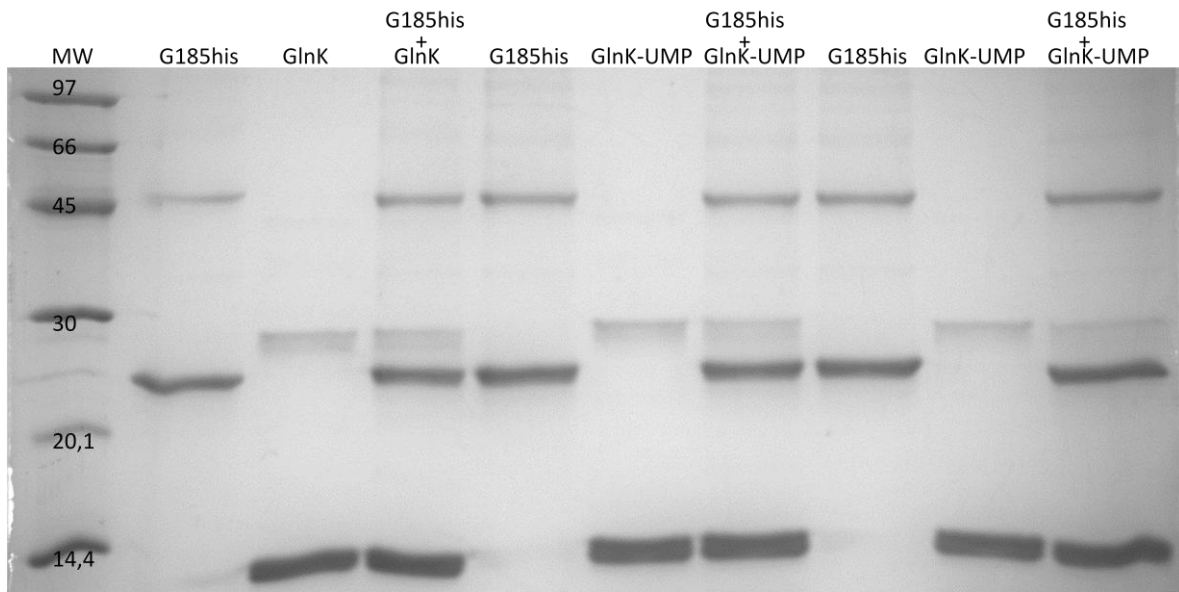
Não foi possível detectar bandas de tamanho compatível com GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub> no eluato da resina MagneHis contendo G185his; tampouco foi possível detectar PII quando hisN185 ou G185his + hisN185 foram imobilizadas na resina. Isso indica que não ocorreu interação entre GlnK e G185his, ou hisN185 nas condições usadas no ensaio, independentemente da presença de ATP, ADP ou 2OG, contrariamente ao observado em outros trabalhos com a proteína NifA de *A. brasilense* (SOTOMAIOR *et al.*, 2012).

#### 4.8.3. Detecção da interação entre o domínio GAF de NifA e GlnK por ligação cruzada

Em uma última tentativa de detectar interação entre GlnK e o domínio GAF de NifA, foram conduzidos ensaios de ligação cruzada usando as proteínas purificadas, conforme descrito em 3.10.8, na presença de efetores de PII. Foram usados sempre 4 μM do dímero de G185his, e 4 μM do trímero de GlnK ou GlnK-UMP<sub>3</sub>. Os géis abaixo mostram os resultados obtidos com 20 minutos de incubação:



	G185his	GlnK	G185his†	G185his	GlnK	G185his†	G185his	GlnK	G185his†
ADP	+	+	+	-	-	-	+	+	+
ATP	-	-	-	+	+	+	-	-	-
2OG	-	-	-	-	-	-	+	+	+



	G185his	GlnK	G185his†	G185his	GlnK-UMP	G185his†	G185his	GlnK-UMP	G185his†
ADP	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ATP	+	+	+	-	-	-	+	+	+
2OG	+	+	+	-	-	-	-	-	-

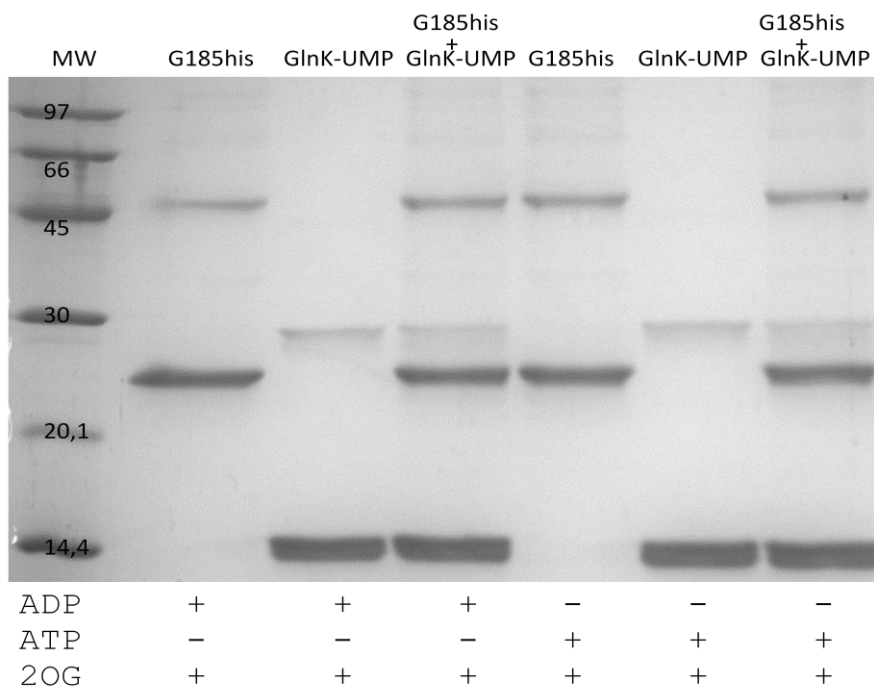


FIGURA 39 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DESNATURANTE DE PRODUTOS DE LIGAÇÃO CRUZADA ENTRE G185his E GlnK. Os sistemas continham 4  $\mu$ M de dímero de G185his e 4  $\mu$ M de trímero de GlnK ou de glnK-UMP<sub>3</sub>, conforme descrito, e a reação ocorreu por 20 minutos. Os sinais de + indicam a presença do efetor (3 mM ADP, 3 mM ATP, 2 mM 2OG); os sinais de -, ausência do efetor.

Todos os sistemas contendo G185his possuem uma banda com cerca de 45 kDa, equivalente a um dímero de G185his, e algumas bandas de peso molecular mais elevado que correspondem a outros estados de oligomerização. Todos os sistemas contendo PII possuem uma banda de cerca de 35 kDa equivalente ao trímero de PII. Os sistemas contendo ambas as proteínas não apresentam nenhuma banda diferencial exclusiva, indicando que não houve interação entre G185his e GlnK.

## CONCLUSÕES

1. A proteína NifA de *H. seropedicae* pode ser ativada por GlnB de *H. seropedicae*, *A. brasilense*, e *E. coli*, e por GlnK de *H. seropedicae*, mas não pode ser ativada por GlnZ de *A. brasilense*.
2. Os resíduos 54, 94, 98, 108, e 110, diferentes entre GlnZ e as demais PII testadas, não são essenciais para a ativação de NifA por PII.
3. A ligação de GlnK a seus efetores (ATP/ADP e 2OG) parece ser importante para a ativação de NifA por PII
4. A presença do resíduo Y51 em GlnK aumenta sua capacidade de ativar NifA, mas não é essencial para esta.
5. Mutações que afetam o sítio de ligação a efetores de PII alteram a capacidade de GlnK ativar NifA.
6. A remoção dos primeiros 135 resíduos de NifA impede GlnK de ativar NifA.
7. Os domínios N-terminal (resíduos 1-185) e Central+C-terminal (resíduos 186-542) de NifA têm estrutura quaternária predominantemente dimérica e monomérica, repectivamente, quando purificados nas condições descritas neste trabalho.
8. A interação entre os domínios N-terminal e Central+C-terminal de NifA pode ser observada in vitro através de ensaios de ligação cruzada.

## REFERÊNCIAS

- ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 458-459, 1997.
- ARAÚJO, A. E. da S.; ROSSETTO, C. A. V.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência agrotecnológica**, v. 34, n. 4, p. 932-939, 2010.
- ARCONDÉGUY, T.; LAWSON, D.; MERRICK, M. Two Residues in the T-loop of GlnK Determine NifL-dependent Nitrogen Control of *nif* Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38452-38456, 2000.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.
- ARSÈNE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830-8, 1996.
- ARSÈNE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P II : effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 339-343, 1999.
- ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 431-447, 1998.
- ATKINSON, M. R.; BLAUKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Context-Dependent Functions of the PII and GlnK Signal Transduction Proteins in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5364-5375, 2002.
- BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K.; LIPSKI, A.; BUSSE, H.-J.; PADUR, L.; WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a novel member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield of the Larsemann Hills, East Antarctica. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, p. 4100-4107, 2013.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Biology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 37-40, 1987.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BATCHELOR, J. D.; LEE, P. S.; WANG, A. C.; DOUCLEFF, M.; WEMMER, D. E. Structural Mechanism of GAF-Regulated  $\sigma^{54}$  Activators from *Aquifex aeolicus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 156–170, 2013.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.; PEDROSA, F. O. Evidence for Two Possible *glnB*-Type Genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 14, p. 4623-4626, 1997.

BERGER, D. K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic domain of NIFA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription in vitro: activation is inhibited by NIFL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 1, p. 103-107, 1994.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S. *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1-2, p. 195-209, 1995.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 241-250, 1995.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. 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 Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 293-299, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII - regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 12, p. 2949-2953, 1971.

BRUHN, C.; LENKE, H.; KNACKMUSS, H. J. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 1, p. 208-210, 1987.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9339-9342, 1991.

CANNON, F. C.; DIXON, R A; POSTGATE, J R; PRIMROSE, S. B. Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *Escherichia coli*. **Journal of general microbiology**, v. 80, n. 1, p. 227-39, 1974.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M. *et al.* *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., three new species isolated in Tenerife (Canary Islands). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2011.

CHEN, S.; DU, J.; WU, L.; ZHAO, Y.; LI, J. Interaction between PII and NifA in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 170-174, 2003.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, CLAUDINE; LI, J.-L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 273, n. 5, p. 415-422, 2005.

CHEN, B.; SYSOEVA, T. A.; CHOWDHURY, S.; NIXON, B. T. Regulation and action of the bacterial enhancer-binding protein AAA+ domains. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 1, p. 89-93, 2008.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 13, p. 3497–3500, 2003.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; *et al.* Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, 2011.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 2, p. 167-172, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 1213–1218, 2007.

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

CREWS, T.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 102, n. 3, p. 279-297, 2004.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; *et al.* 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of Two Structurally Similar but Functionally Different PII Proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143-4149, 1996.

de ZAMAROCZY, M. Coexistence of Two Structurally Similar but Functionally Different PII Proteins in *Azospirillum brasilense*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 449-463, 1998.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2223–2230, 2004.

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

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil biology and biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.

DOBRTSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1418–1426, 2010.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

DREPPER, T. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2203-2212, 2003.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *NifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO Journal**, v. 5, n. 2, p. 441-447, 1986.

EGENER, T.; SARKAR, A.; MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Identification of a NifL-like protein in a diazotroph of the  $\beta$ -subgroup of the Proteobacteria, *Azoarcus* sp. strain BH72. **Microbiology**, v. 148, p. 3203–3212, 2002.

el-KOMY, H. M. A.; SAAD, O. A. O.; HETTA, A. M. A. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using  $^{15}\text{N}$ -dilution method. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 6, p. 787-793, 2003.

ERZBERGER, J. P.; BERGER, J. M. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 35, p. 93-114, 2006.

FIEDLER, U.; WEISS, V. A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. **The EMBO journal**, v. 14, n. 15, p. 3696-3705, 1995.

FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3168-3175, 1989.

GILLER, K. E.; CADISCH, G. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1-2, p. 255-277, 1995.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

GLÖER, J.; THUMMER, R.; ULLRICH, H.; SCHMITZ, R. A. Towards understanding the nitrogen signal transduction for *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **The FEBS journal**, v. 275, n. 24, p. 6281-6294, 2008.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-86, 1994.

HANSON, P. I.; WHITEHEART, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. **Nature reviews: molecular cell biology**, v. 6, p.519-529, 2005.

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

HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P. *et al.* The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3942-3947, 2000.

HELLING, R. B. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4571-4575, 1998.

HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, p. 51-59, 1989.

HO, Y. S.; BURDEN, L. M.; HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **The EMBO journal**, v. 19, n. 20, p. 5288-99, 2000.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965-2982, 1996.

HUERGO, L. F.; FILIPAKI, A.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 47-54, 2005.

HUERGO, LUCIANO FERNANDES. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2006.

HURLEY, JAMES H. GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2003, n. 164, p. PE1, 2003.

IM, W.-T.; BAE, H.-S.; YOKOTA, A.; LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 851–855, 2004.

IISMAA, S. E.; WATSON, J. M. The NifA gene product from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* lacks the N-terminal domain found in other NifA proteins. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 943-955, 1989.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28, 1990.

IYER, L. M.; LEIPE, D. D.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. **Journal of structural biology**, v. 146, p. 11-31, 2004.

JAGGI, R.; HEESWIJK, W. C. VAN; WESTERHOFF, H. V.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **The EMBO journal**, v. 16, n. 18, p. 5562-5571, 1997.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. *et al.* Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530-8538, 2004.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; TIRASPHON, 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. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 4342-4353, 1997.

JIANG, P.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. **Biochemistry**, v. 46, p. 12979-12996, 2007.

JUNG, S.-Y.; LEE, M.-H.; OH, T.-K.; YOON, J.-H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2284-2288, 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 895-899, 1983.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 3, p. 367-376, 1989.

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

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 3493-77, 2007.

LIU, Y.; KAHN, M. L. ADP-ribosylation of *Rhizobium meliloti* glutamine synthetase III in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 4, p. 1624-1638, 1995.

LU, H.; SHI, L. Characterization of chemolithoautotrophic growth *Herbaspirillum* sp. isolated from volcanic environment in Miyake-jima island, Japan. **Advanced Materials Research**, v. 668, p. 924-927, 2013.

MA, Y.; LUDDEN, PAUL W. Role of the dinitrogenase reductase arginine 101 residue in dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase binding, NAD binding, and cleavage. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 250-256, 2001.

MACHADO, I. M.; YATES, M G; MACHADO, H. B.; SOUZA, E M; PEDROSA, F O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes nifHDK of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, n. 12, p. 1599-1602, 1996.

MAIER, S.; SCHLEBERGER, P.; LU, W.; WACKER, T.; PFLÜGER, T.; LITZ, C.; ANDRADE, S. L. A. Mechanism of Disruption of the Amt-GlnK Complex by PII-Mediated Sensing of 2-Oxoglutarate. **Plos One**, v. 6, n. 10, p. e26327, 2011.

MARCHUK, D.; DRUMM, M.; SAULINO, A.; COLLINS, F. S. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 5, p. 1154, 1990.

MARTÍNEZ-ARGUDO, I.; CONTRERAS, A. PII T-Loop Mutations Affecting Signal Transduction to NtrB Also Abolish Yeast Two-Hybrid Interactions. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 13, p. 3746-3748, 2002.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601-610, 2004.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W; PÜHLER, A.. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *NifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 212, n. 1, p. 27-37, 1988.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 604-622, 1995.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; *et al.* Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS letters**, v. 447, n. 2-3, p. 283-286, 1999.

MONTEIRO, R A; SOUZA, E M; YATES, M G; PEDROSA, F O; CHUBATSU, L S. *In-trans* regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS microbiology letters**, v. 180, n. 2, p. 157-161, 1999.

MONTEIRO, R. A.. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2001.

MOURE, V. R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, L. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. 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, 2011.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SCARDUELLI, M.; GERHARDT, E. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; SEEFELDT, L. C. The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279-286, 2013.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157-164, 1999.

NOINDORF, L. **Identificação e caracterização do operon orf1glnKamtB e do gene amtH de Herbaspirillum seropedicae**. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2006.

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

OGURA, T.; WILKINSON, A. J. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. **Genes to Cells**, v. 6, p. 575-597, 2001.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, M. A. S.; BAURA, V. A.; AQUINO, B. *et al.* Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Research in microbiology**, v. 160, n. 6, p. 389-395, 2009.

OLIVEIRA, M. A. S. **Estudo da regulação da atividade da proteína NifA de Herbaspirillum seropedicae em resposta aos níveis de amônio e oxigênio**. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2010.

OLIVEIRA, M. A. S.; AQUINO, B.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Interaction of GlnK with the GAF domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA mediates NH<sub>4</sub><sup>+</sup> regulation. **Biochimie**, v. 94, p. 1041-1047, 2012.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; *et al.* Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 189-195, 2001.

PASCHEN, A.; DREPPER, T; MASEPOHL, B; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus* NifA mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium. **FEMS microbiology letters**, v. 200, n. 2, p. 207-213, 2001.

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

PÉREZ-MARTÍN, J.; LORENZO, V. The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9392-9396, 1995.

PORTER, S. C.; NORTH, A. K.; WEDEL, A. B.; KUSTU, S. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. **Genes & Development**, v. 7, n. 11, p. 2258-2273, 1993.

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

RAJENNDRAN, C.; GERHARDT, E. C. M.; BJELIC, S.; GASPERINA, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 47, p. 18972-18976, 2011.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 829-836, 2001.

RODRIGUES, T. R.; 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.

RODRIGUES, T. E. **Identificação e estudo *in vitro* da interação de proteínas PII com a proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP) em *Escherichia coli***. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, FABIO O; *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I. *et al.* *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. Pt 6, p. 1341-1348, 2006.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. T.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND JR, D. E. Phosphorylation Site of NtrC, a Protein Phosphatase Whose Covalent Intermediate Activates Transcription. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 5117-5122, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHMID, M.; BALDANI, J. I. V. O.; HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes**. Springer, 2004, v. 5, p. 141-150, 2006.

SCHWAB, S. **Identificação e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Paraná, 2006.

SHAH, V. K.; BRILL, W. J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3249-3253, 1977.

SHINGLER, V. Signal sensing by  $\sigma^{54}$ -dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409-416, 1996.

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

SIMS, A. P.; FOLKES, B. F. A Kinetic Study of the Assimilation of [ $^{15}\text{N}$ ]-ammonia and the Synthesis of Amino Acids in an Exponentially Growing Culture of *Candida utilis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 159, n. 976, p. 479-502, 1964.

SOTOMAIOR, P.; ARAÚJO, L. M.; NISHIKAWA, C. Y.; HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. Effect of ATP and 2-oxoglutarate on the *in vitro* interaction between the NifA GAF domain and the GlnB protein of *Azospirillum brasilense*. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 12, p. 1135-1140, 2012.

STEFANELLO, A. A. **Mutagenese e análise funcional do domínio N-terminal de NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. 89 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

STUDHOLME, D. J.; DIXON, R. Domain Architectures of  $\sigma^{54}$ -Dependent Transcriptional Activators. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1757-1767, 2003.

TABOR, S.; RICHARDSON, C. C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. February, p. 1074-1078, 1985.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; LI, X.-D.; WINKLER, F. K. A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, p. 531-539, 2010.

TULI, R.; MERRICK, M. J. Over-production and characterization of the *NifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae* - the transcriptional activator of *nif* gene expression. **Journal of General Microbiology**, v. 134, n. 2, p. 425-432, 1988.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.-M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W. *et al.* Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological applications**, v. 7, n. 3, p. 737-750, 1997.

WARREN, D. J. Preparation of highly efficient electrocompetent *Escherichia coli* using glycerol/mannitol density step centrifugation. **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 206-207, 2011.

WASSEM, R; SOUZA, E M DE; YATES, M G; PEDROSA, F. D.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent NifA promoter. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 4, p. 756-764, 2000.

WASSEM, ROSELI. **Regulação da transcrição do gene NifA de Herbaspirillum seropedicae pelas proteínas NtrC, NifA e IHF.** Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2000.

WEBER, O B; BALDANI, V L D; TEIXEIRA, K. R. S. *et al.* Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, n. 1, p. 103-113, 1999.

WOEHLE, D. L.; LUEDDECKE, B. A; LUDDEN, P W. ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* in vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 23, p. 13741-13749, 1990.

WOOTTON, J. C.; DRUMMOND, M. H. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 2, n. 7, p. 535-543, 1989.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; VASUVEDAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-Homologue: Structure Reveals ATP Binding Site and Indicates how the T-loops may be Involved in Molecular Recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, p. 149-165, 1998.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L. *et al.* Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14674-14679, 2000.

ZHANG, I; POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Mutagenesis and Functional Characterization of the *glnB*, *glnA*, and *NifA* Genes from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 4, p. 983-992, 2000.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2782-2787, 2004.

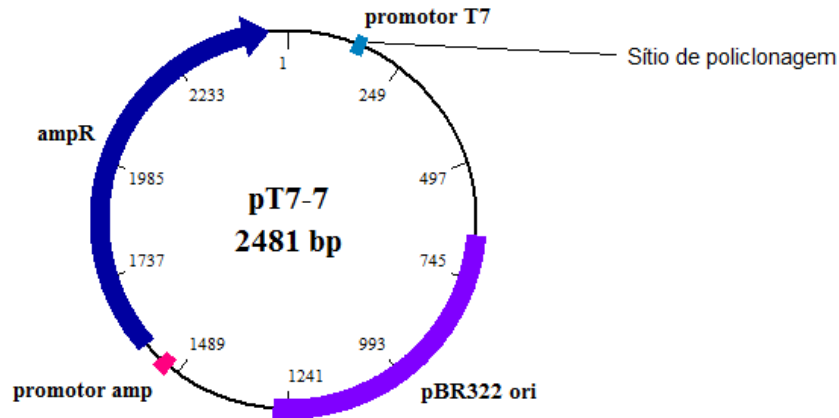
ZHOU, X. Y.; ZOU, X. X.; LI J. L. Interaction between GlnB and the N-terminal domain of NifA in *Azospirillum brasilense*. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 22, p. 3546-3552, 2008.

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

ZOU, X.; ZHU, Y.; POHLMANN, E. L. *et al.* Identification and functional characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 154, n. 9, p. 2689-99, 2008.

ANEXOS

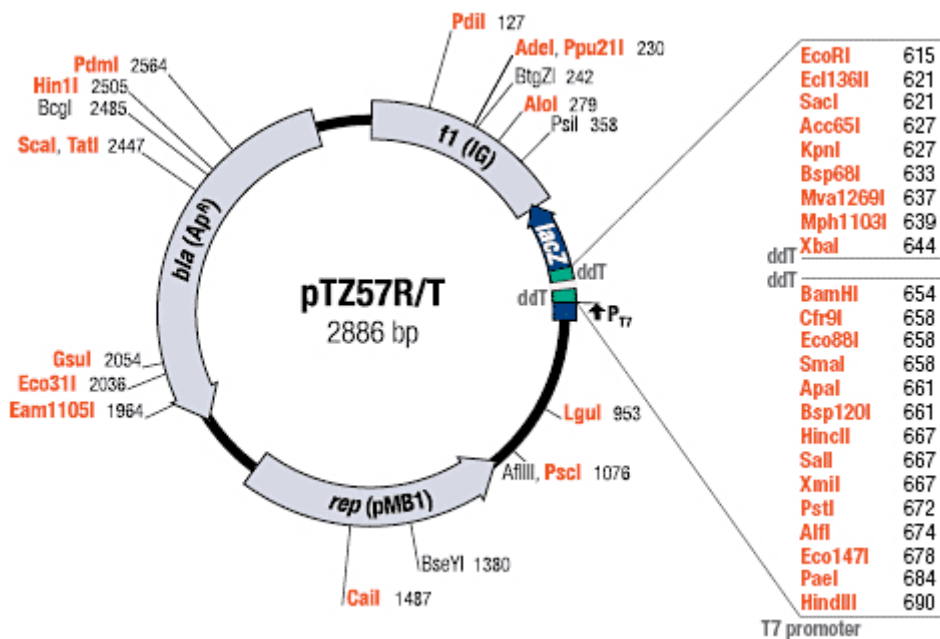
ANEXO 1 – Vetor pT7-7



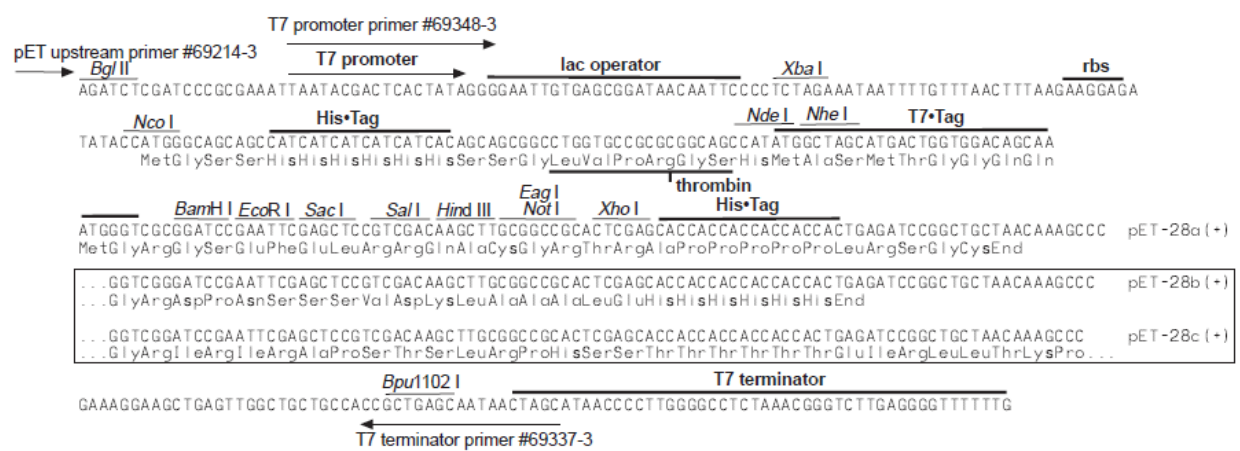
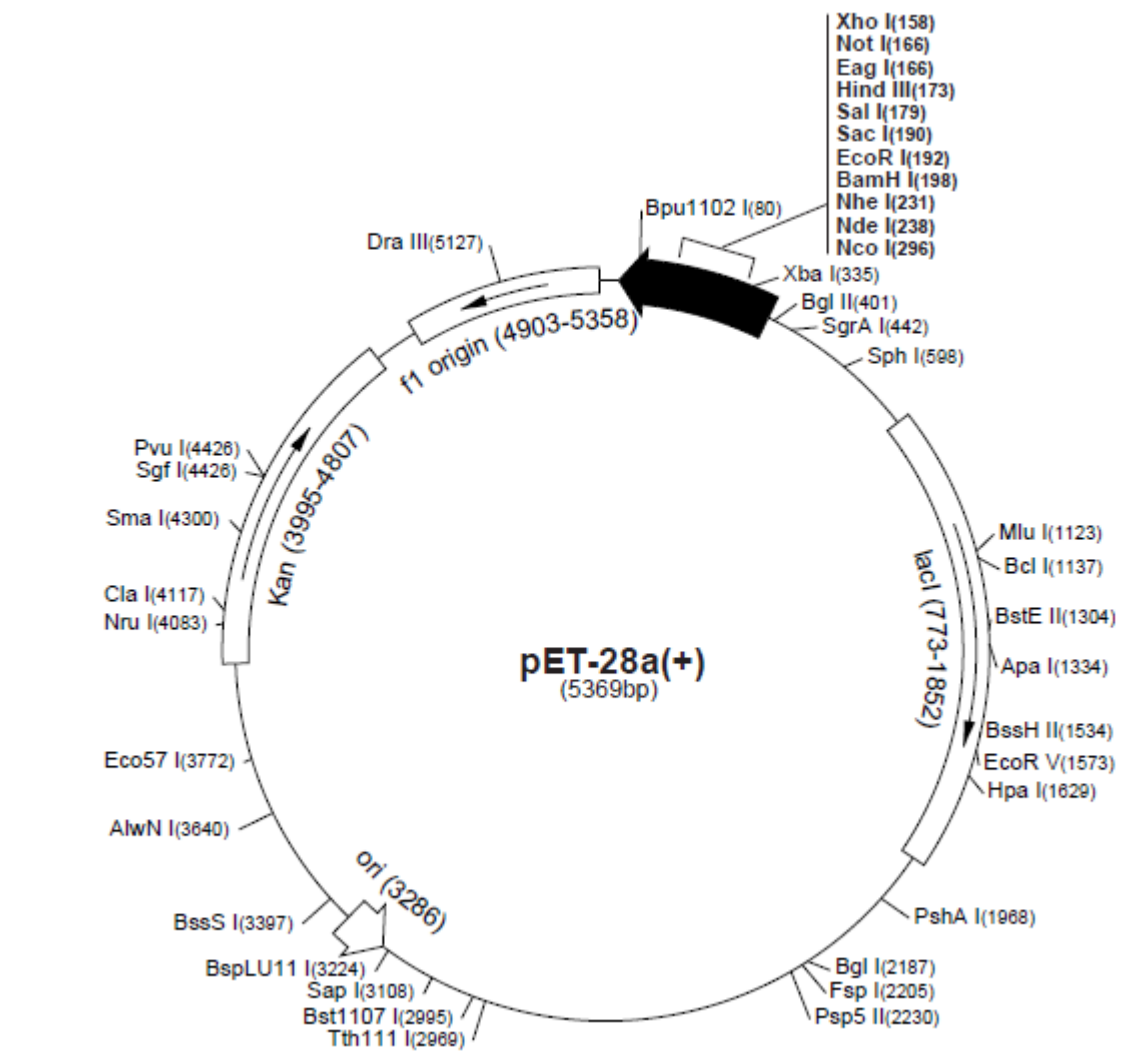
SmaI
XbaI  
 CGATTTCGAACCTCTCGATTTTCGAACCTTCTGATAGACTTCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGA  
T7 prom.

NdeI
EcoRI
BamHI
XbaI
Sall
PstI
HindIII  
 AATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGAAATTCGCGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTATC  
RBS

ANEXO 2 – vetor pTZ57R

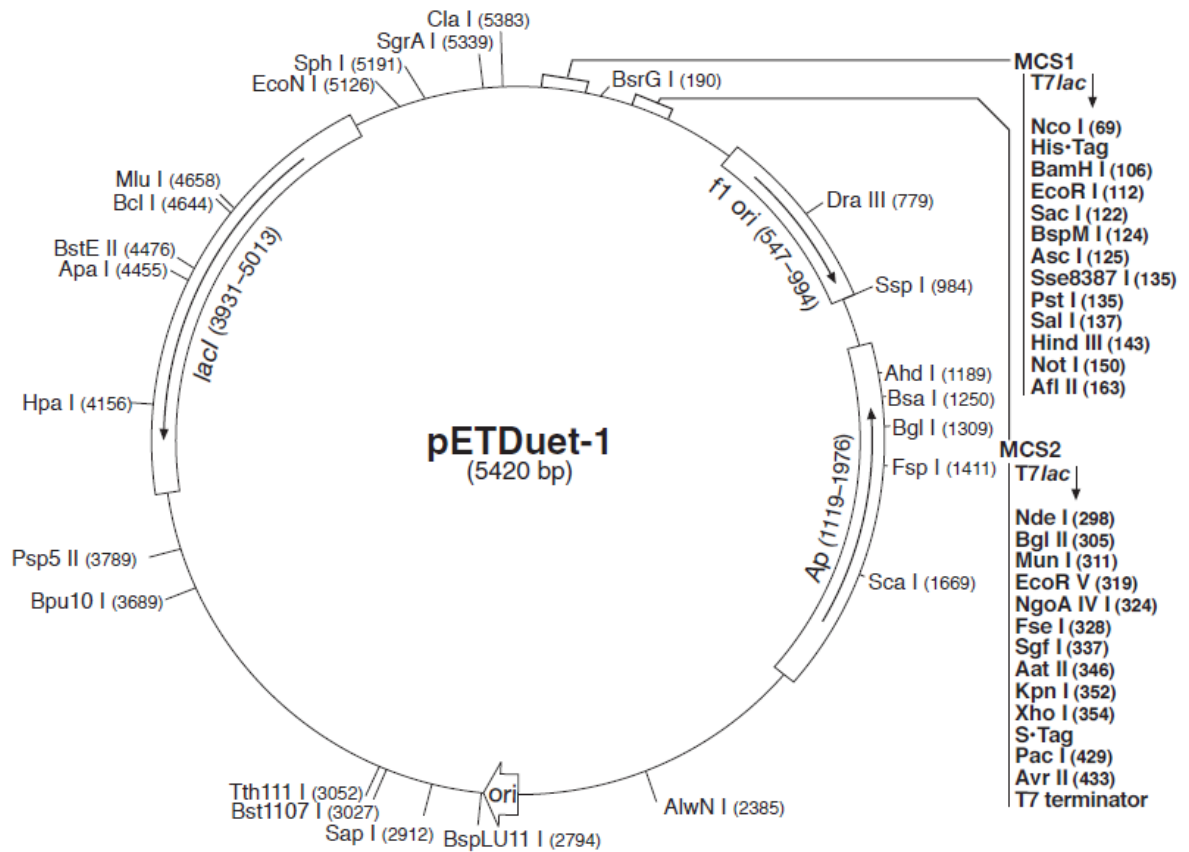


ANEXO 3 – Vetor pET28a



pET-28a-c(+) cloning/expression region

ANEXO 4 – vetor pETDuet1



pETDuet-1 cloning/expression regions