

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINE GOEDERT

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE A PROTEÍNA GLNZ COM AS
ENZIMAS OROTATO FOSFORIBOSILTRANSFERASE E RNASE PH EM *Azospirillum*
*brasiliense***

CURITIBA
2018

ANA CAROLINE GOEDERT

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE A PROTEÍNA GLNZ COM AS
ENZIMAS OROTATO FOSFORIBOSILTRANSFERASE E RNASE PH EM *Azospirillum*
*brasile***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Dr. Luciano Fernandes Huergo

Co-orientadora: Dra. Edileusa Marques Gerhardt

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Goedert, Ana Caroline

Caracterização da interação *in vitro* entre a proteína GlnZ com as enzimas orotato fosforibosiltransferase e RNASE PH em *Azospirillum brasilense*. / Ana Caroline Goedert. – Curitiba, 2018.

94 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Luciano Fernandes Huergo

Co-orientadora: Edileusa Marques Gerhardt

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

1. Proteínas. 2. Proteobacteria. 3. Enzimas. I. Título II. Huergo, Luciano Fernandes. III. Gerhardt, Edileusa Marques. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

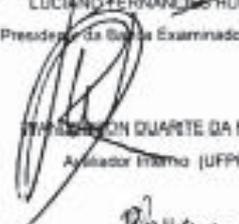
TERMO DE APROVAÇÃO

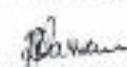
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA CAROLINE GODEDERT** intitulada: **Caracterização da interação in vitro entre a proteína GlnZ com as enzimas orotato fosforibosiltransferase e RNASE PH em *Azospirillum brasilense***, após terem inquirido a autora e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Março de 2018.


LUCIANO FERNANDO RUELERO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


EMERSON DUARTE DA ROCHA
Avaliador Interno (UFPR)


ROSELI WASSEM
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho ao meu irmão
Itamar A. Goedert que faleceu durante a
execução desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço em especial ao meu orientador professor Dr. Luciano Fernandes Huergo, primeiro por me aceitar como aluna no mestrado, e em segundo lugar pela paciência, por todo o tempo e atenção dedicados a este trabalho e a mim, meu muito obrigado.

A Dra. Edileusa C. Gerhardt, primeiro por aceitar me co-orientar durante este trabalho e segundo por ter sido paciente, solícita, generosa e principalmente por ter se tornando uma grande amiga a qual admiro muito.

A Dra. Leda Chubatsu pela atenção e dedicação na correção do meu projeto e relatório do mestrado.

Aos professor Dr. Wanderson Rocha e Dra. Roseli Wassen por terem dedicado seu tempo e aceitado fazer parte da banca avaliadora dessa dissertação.

A todos os professores do grupo de fixação biológica, principalmente ao professor Dr. Fabio Pedrosa e Emanuel Maltempi de Souza, pela inspiração e exemplo.

Ao curso de pós graduação em Ciências (Bioquímica), do Setor de Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa de sua coordenadora Dra. Glaucia Regina Martinez, pelo suporte recebido, e a todos os demais professores do grupo. A CAPES e demais agências financiadoras pelo suporte financeiro.

Aos técnicos do núcleo de fixação biológica de nitrogênio, Roseli Prado e Valter de Baura por tornar o nosso trabalho infinitamente mais fácil.

Ao meu primeiro orientador, incentivador e mestre Dr. Marcos Luiz Pessatti porque sem suas inspiradoras aulas de bioquímica eu não estaria aqui hoje, mas principalmente pela pessoa extraordinária que você é, por tudo que me ensinou durante os três anos que fiz parte do seu laboratório.

Ao Msc. Adrian Richard Schenberger por todo apoio, principalmente nas discussões sobre as interações e na purificação e gel filtração das proteínas. Sem contar as melhores imitações que só você sabe fazer!

A Msc. Fernanda Gravina por ter se tornando uma amiga/irmã durante o mestrado, agradeço por todo o apoio psicológico e laboratorial. Obrigada por ser sempre o ombro amigo disposta a ouvir meus problemas e me ajudar. Agradeço ainda pela ajuda com o modelo de regulação.

Aos amigos de laboratório Gillize, Alysson, Heloisa e Marcelo obrigado por terem sido a melhor parte do meu dia nos melhores e piores dias. Vocês são os melhores cantores do Mundo!

Aos demais colegas da 271/272 e a todos os colegas do grupo NFN por tornarem os dias tão agradáveis e por toda a ajuda durante meu mestrado.

Aos meus melhores amigos e incentivadores Alberto Paulo de Borba, Ana Winter, Débora Schirmer, Philipe Gabriel, Leonardo Bellincanta, Letícia Malacoski, Mariana Masson e Veronica Rossetto não tenho palavras suficientes para agradecer a presença de vocês na minha vida! Vocês são especiais demais, obrigada pelo apoio sempre!

A minha família, principalmente meus pais Gilmar Pedro Goedert e Francisco Scheller Júnior, minha avó/mãe Ágata e minha irmã Maria por acreditarem em mim desde o começo dessa jornada, por terem sido meu porto seguro durante esses dois longos anos e por todo o amor, carinho e compreensão que sempre posso esperar de vocês. Agradeço também ao meu namorado Luis Fernando Adiers Korb pela compreensão, carinho, cuidado e paciência durante todo o mestrado, mas principalmente durante os últimos três meses.

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma α -proteobacteria, capaz de fixar nitrogênio, que tem sido extensivamente estudada devido suas capacidade de colonização em plantas de interesse econômico. *A. brasilense* possui duas proteínas PII, GlnZ e GlnB. As PII são proteínas sinalizadoras conhecidas por sua regulação no metabolismo de nitrogênio, onde interagem com uma variedade de proteínas, fatores de transcrição e proteínas de membrana. As PII sinalizam os níveis energéticos por meio da ligação de ATP/ADP, os níveis de amônio pelo estado de modificação pós-traducional, e os níveis de carbono/nitrogênio pela ligação ao 2-OG. As interações proteína-proteína que envolvem as PII no metabolismo de nitrogênio são bem caracterizadas. Entretanto, estudos recentes tem mostrado que o papel dessas proteínas se estende ao metabolismo de carbono pela regulação da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC) em vários organismos. Tendo em vista esse novo panorama de regulação por PII, ensaios foram realizados para a obtenção de possíveis novos alvos. Dois desses alvos são as proteínas Orotato fosforibosiltransferase (PyrE) e Ribonuclease PH (Rph). PyrE faz parte da via de síntese “de novo” de pirimidinas, enquanto a função de Rph não é completamente entendida, mas sabe-se da sua relação na maturação de tRNA e rRNA, além do seu papel na degradação de RNA estável quando em privação de nutrientes. Este trabalho teve como objetivo a caracterização da interação das proteínas PyrE e Rph com GlnZ *in vitro*. Para isso ambos os genes foram clonados em vetores de expressão. As proteínas PyrE e Rph foram purificadas com e sem cauda de histidina, e foram realizados ensaios de interação na presença dos efetores de PII, ATP, ADP e 2-OG e também de GlnZ uridililada e GlnZ com deleção do *loop* T. Os resultados mostram que ambas as proteínas interagem com GlnZ na presença de ADP com baixo 2-OG, uma condição igual aquela observada em choque de amônio. Os resultados obtidos nos permitiram a elaboração de um modelo de regulação que deve ser aprimorado com estudos mais aprofundados da interação entre GlnZ-PyrE e GlnZ-Rph. A interação de GlnZ com as proteínas PyrE e Rph sugere um papel de PII na regulação dos metabolismos de pirimidinas e no de RNA.

Palavras Chave: proteínas PII, interação, orotato fosforibosiltransferase, Ribonuclease PH.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a α -proteobacterium capable of fixing nitrogen that has been extensively studied due to its ability to colonize plants of economic interest. *A. brasilense* encodes two PII-like proteins, GlnZ and GlnB. PII are signaling proteins known for their participation in the regulation of nitrogen metabolism, by interacting with a variety of proteins, transcription factors and membrane proteins. PII proteins are able to sense energy levels through ATP/ADP binding, ammonium levels accordingly to their post-translational modification status, and carbon/nitrogen levels by allosteric interaction with 2-oxoglutarate (2-OG). Protein-protein interactions involving PII are well characterized in nitrogen metabolism. However, recent studies have shown that the role of PII extends to carbon metabolism by regulating the Acetyl-CoA carboxylase (ACC) enzyme in bacteria and plants. In view of this new panorama of PII regulation, experiments were carried out to identify new PII binding targets. Two of the identified protein targets were the Orotate phosphoribosyltransferase (PyrE) and the Ribonuclease PH (Rph) enzymes. PyrE is part at the "de novo" pyrimidines biosynthesis pathway. On the other hand, the function of the Rph enzyme is not fully understood; it is assumed that Rph participates in the maturation of tRNA and rRNA and degradation of stable RNA during nutrient deprivation. This work aimed to characterize the interaction of PyrE and Rph proteins with the PII protein GlnZ *in vitro*. The *pyrE* and *rph* genes were cloned into expression vectors, the PyrE and Rph proteins purified and assessed for interaction with GlnZ. Both PyrE and Rph interacted with GlnZ *in vitro* in the presence of ADP under a low 2-OG regime, conditions resembling those expected to occur upon an ammonium shock *in vivo*. The results obtained allowed us to postulate regulation role of GlnZ in the regulation of the activities of PyrE and Rph. The interaction between GlnZ and PyrE and Rph proteins support a role of PII proteins in the regulation of pyrimidine and RNA metabolism.

Key Words: PII proteins, interactions, Orotate phosphoribosyltransferase, Ribonuclease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de assimilação de amônio em <i>Escherichia coli</i> ..	22
Figura 2. Sítios de modificações pós traducionais em proteínas PII.....	25
Figura 3. Sítio de ligação a ATP, ADP e 2-OG em GlnZ de <i>Azospirillum brasilense</i>	27
Figura 4. Primeira etapa da via de síntese “De novo” de pirimidinas em <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i>	32
Figura 5. Via de síntese “De novo” e Salvamento de Pirimidinas em <i>L. lactis</i>	34
Figura 6. Reação catalisada pela OPRTase.....	35
Figura 7. Estrutura tridimensional da proteína OMP sintase de <i>Salmonella typhimurium</i>	36
Figura 8. Importância do metabolito 5’ fosforibosil- α -1-pirofosfato (PRPP).....	37
Figura 9. Comparação entre degradação e maturação do mRNA e RNA estável em <i>Escherichia coli</i>	39
Figura 10. Estrutura da Ribonuclease PH de <i>Aquifex aeolicus</i>	40
Figura 11. Perfil eletroforético das ampliações do gene <i>rph</i> e <i>pyrE</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	55
Figura 12. Perfil eletroforético da restrição dos plasmídeos pAGRPHhis e pAGPYREhis.....	56
Figura 13. Perfil eletroforético da purificação da proteína His- GlnZ de <i>Azospirillum brasilense</i>	57
Figura 14. Perfil eletroforético da purificação da proteína Rph-His de <i>A. brasilense</i>	58
Figura 15. Perfil eletroforético da purificação da proteína PyrE-His de <i>Azospirillum brasilense</i>	59
Figura 16. Perfil eletroforético da expressão e da propriedade de ligação em resinas de Rph nativa de <i>Azospirillum brasilense</i>	61
Figura 17. Perfil eletroforético da purificação da proteína Rph nativa de <i>Azospirillum brasilense</i>	62
Figura 18. Perfil eletroforético da expressão e da propriedade de ligação em resinas de PyrE nativa de <i>Azospirillum brasilense</i>	63
Figura 19. Perfil eletroforético da purificação da proteína PyrE nativa de <i>Azospirillum brasilense</i>	64
Figura 20. Perfil de PyrE em Superose 6.....	65
Figura 21. Ilustração de como ocorre o ensaio de co-precipitação (<i>pull-down</i>) <i>in vitro</i>	66
Figura 22. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na ausência ou presença de diferentes detergentes.....	68
Figura 23. Eletroforese do ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na ausência ou presença de todos os efetores de PII e suas combinações.....	69
Figura 24. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His, GlnZ- Δ loop, GlnZ-UMP e GlnB-His e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença dos efetores ADP e ATP de PII.....	70
Figura 25. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com His-GlnZ e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença de diferentes concentrações de ADP.....	71
Figura 26. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença de diferentes concentrações de ATP.....	72

Figura 27. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença de diferentes taxas de ATP/ADP.	73
Figura 28. Eletroforese do ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His e PyrE de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença de diferentes taxas de ATP/ADP e concentrações de 2-OG.....	74
Figura 29. Via de Síntese “De novo” e Salvamento de Purinas em <i>L. lactis</i>	75
Figura 30. Eletroforese do ensaio de co-precipitação (<i>pull-down</i>) <i>in vitro</i> com His-GlnZ e Rph de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença de todos os efetores de PII e suas combinações.....	76
Figura 31. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com His-GlnZ e Rph de <i>Azospirillum brasilense</i> na ausência ou presença de diferentes detergentes.	77
Figura 32. Ensaio de Co-precipitação (<i>Pull Down</i>) <i>in vitro</i> com GlnZ-His e Rph de <i>Azospirillum brasilense</i> na presença de diferentes concentrações de ADP.....	78
Figura 33. Modelo de regulação das proteínas PyrE e Rph pela proteína PII, GlnZ de <i>Azospirillum brasilense</i>	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESTIRPES BACTERIANAS.....	44
TABELA 2. PLASMÍDEOS.....	44
TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS PARA ESTE TRABALHO E RESPECTIVAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.	46
TABELA 4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI/TOF.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-Oxoglutarato
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ADP	5' difosfato de adenosina
AMP	5' monofosfato de adenosina
AO	Ácido Orótico
AR	Função removedora de adenilil (ATase)
AT	Função de adenililação (ATase)
ATP	5' trifosfato de adenosina
BSA	Albumina bovina
Cm ^r	Resistência a cloranfenicol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAD	Dinucleotideo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotideo de flavina
GMP	Monofosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
IMP	Inositol monofosfato
IPTG	Isopropil β-D-1- tiogalactopiranosideo
Kb	Kilobases
Km ^r	Resistência a canamicina
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted laser desorption- Time of Flight</i>
NAD ⁺	Dinucleotideo de nicotinamida oxidado
NADH	Dinucleotideo de nicotinamida reduzido
NADP	Fosfato dinucleotideo de nicotinamida
NAGK	Acetil glutamato quinase
Na ^r	Resistência ao ácido nalidíxico
Ntr	Sistema de regulação de nitrogênio
OMP	Oritidina 5' monofosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PpGpp	Guanosina tetrafosfato
PRPP	Pirofosforibosil monofosfato

Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em géis de poliacrilamida
Sm _r	Estreptomicina
THF	Tetrafolato
UMP	Uridina monofosfato
UR	Removedor de uridilil
UT	Função de uridililação
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta
V/V	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. NITROGÊNIO	19
2.2. ORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO: GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i>	19
2.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	20
2.4. PROTEÍNAS PII	23
2.4.1. <i>Modificações Pós-Traducionais em PII</i>	24
2.4.2. <i>Ligação a efetores</i>	26
2.4.3. <i>Papel das proteínas PII como reguladoras da fixação biológica de nitrogênio</i>	28
2.4.4. <i>Outras proteínas alvos de PII</i>	31
2.5. VIA DE SÍNTESE “DE NOVO” DE PIRIMIDINAS	31
2.6. OPRTASES OU OMP SINTASES	35
2.7. A PROTEÍNA RIBONUCLEASE PH	38
3. JUSTIFICATIVA	42
4. OBJETIVOS	43
4.1. OBJETIVO GERAL	43
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5. METODOLOGIA	44
5.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	44
5.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO	45
5.3. ANTIBIÓTICOS	46
5.4. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	46
5.5. ELETROFORESE DE DNA	46
5.6. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR	47
5.7. ENSAIOS DE RESTRIÇÃO E LIGAÇÃO	47
5.8. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	47
5.8.1. <i>Preparo de Células</i>	47
5.8.2. <i>Transformação</i>	48
5.9. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO	48
5.10. ANÁLISE DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	49
5.11. SUBCLONAGEM DOS GENES <i>PYRÉ</i> E <i>RPH</i>	49
5.12. SEQUENCIAMENTO DE DNA	49
5.13. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE	50

5.14.	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	50
5.15.	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNA PYRE-HIS E RPH-HIS DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	50
5.16.	TESTE DE RESINA PARA PROTEÍNAS NATIVAS.....	51
5.17.	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RPH NATIVA DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	52
5.18.	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PYRE NATIVA DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	52
5.19.	CROMATOGRAFIA EM GEL FILTRAÇÃO EM SUPEROSE 6	52
5.20.	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII.....	53
5.21.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	53
5.22.	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MALDI-TOF/MS.....	53
5.23.	ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO (<i>PULL-DOWN</i>) <i>IN VITRO</i>	54
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1.	CLONAGEM DOS GENES <i>PYRE</i> E <i>RPH</i> DE <i>A. BRASILENSE</i>	55
6.2.	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	57
6.2.1.	<i>Purificação das proteínas PII</i>	57
6.2.2.	<i>Expressão e purificação de Rph-His e PyrE-His de Azospirillum brasilense</i>	58
6.2.3.	<i>Expressão e Purificação de Rph nativa</i>	59
6.2.4.	<i>Expressão e purificação de PyrE nativa</i>	62
6.3.	IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF	65
6.4.	ENSAIOS DE CO-PRECIPITAÇÃO DE PYRE E PROTEÍNAS PII	66
6.5.	ENSAIOS DE CO-PRECIPITAÇÃO ENTRE RPH E GLNZ	76
7.	CONCLUSÃO	81
8.	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

Em Proteobacteria, o metabolismo do nitrogênio é regulado por um sistema conhecido como Ntr, o qual é ativado quando não há disponibilidade de amônio, permitindo a transcrição de genes relacionados à utilização de fontes alternativas de nitrogênio (MERRICK; EDWARDS, 1995). As proteínas PII exercem um papel essencial na regulação deste sistema. Essas proteínas estão presentes em bactérias, arqueas, algas e plantas, e tem uma estrutura altamente conservada, com três *loops* T, C e B, que estão relacionados com a ligação a efetores e interação com outras proteínas (DIXON; KAHN, 2004; HUERGO *et al.*, 2012).

Azospirillum brasilense possui duas proteínas PII, GlnB e GlnZ. Assim como as outras proteínas PII conhecidas, sensoriam os níveis energéticos da célula pela ligação competitiva de ATP e ADP, e também os níveis de amônio intracelular, por meio de GlnD, que sensoria os níveis de glutamina e em resposta uridilila/desuridilila as PII. PII também sensoria o balanço entre nitrogênio e carbono pela ligação do metabólito 2-oxoglutarato (HUERGO *et al.*, 2012; NINFA; JIANG, 2005; TRUAN *et al.*, 2010). Estudos recentes têm demonstrado que o papel das proteínas PII na regulação do metabolismo pode ser mais amplo do que se imagina, não ficando restrita ao metabolismo de nitrogênio, visto que PII interage também com a enzima Acetil-CoA Carboxilase, que faz parte do metabolismo de ácidos graxos (BOURRELLIER *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2014; GERHARDT *et al.*, 2015; HUERGO; DIXON, 2015).

Gerhardt (2015) buscou novos alvos de PII por meio de ensaios de co-purificação com as proteínas PII e extrato de *Azospirillum brasilense* 2812. As análises realizadas geraram uma lista de possíveis alvos, dos quais fazem parte proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, nucleotídeos, poliaminas, resposta estrigente, metabolismo de RNA, entre outras. Duas das proteínas detectadas nesse ensaio foram a OPRTase (PyrE ou Orotato fosforibosiltransferase), relacionada ao metabolismo de nucleotídeos e a Ribonuclease PH (Rph), envolvida no metabolismo de RNA.

PyrE é a quarta enzima da via de síntese “de novo” de pirimidinas, catalisando a produção de orotidina 5-monofosfato, precursor das bases pirimídicas. A reação catalisada por PyrE envolve a adição do grupo fosforibosil pirofosfato (PRPP) ao orotato, na presença de Mg^{+2} para formação de OMP (BHATIA *et al.*, 1990). Esta enzima é regulada negativamente a nível de substrato pelo produto da via, o UMP e UTP, e a nível transcricional por atenuação da transcrição na presença de UTP (TURNBOUGHT, SWITZER, 2008). O gene *pyre* e *rph* encontram-se no mesmo operon em *Escherichia coli*, e este operon é sensível ao UTP

(ANDERSEN *et al.*, 1992). O PRPP é utilizado como esqueleto tanto para a síntese de purinas quanto de pirimidinas, e em gram positivas é conhecido pela regulação das proteínas PyrR e PurR, proteínas regulatórias da transcrição dos operons relacionados a síntese das bases pirimídicas e púricas, respectivamente. Além disso, o PRPP é utilizado na síntese de nicotinamidas como NAD⁺ e NADP⁺ e síntese dos aminoácidos histidina e triptofano (KILSTRUP *et al.*, 2005; HOVE-JENSEN *et al.*, 2017), mostrando sua importância e versatilidade no anabolismo celular.

Ribonuclease PH é uma exorribonuclease 3'-5' fosfato dependente (ZUO; DEUTSCHER, 2002) responsável pela maturação de tRNA, e do precursor do RNA 16S, o 17S, além da degradação de RNA estável quando em limitação nutricional (DEUTSCHER, 2003; SULTHANA *et al.*, 2016; SULTHANA *et al.*, 2017). Sua regulação é pouco conhecida, mas trabalhos recentes tem demonstrado que Rph pode ser regulada por outra ribonuclease, a Rnase II (SULTHANA *et al.*, 2017).

Este trabalho tem como objetivo caracterizar a interação entre as proteínas PII e as proteínas Orotato fosforibosiltransferase e Ribonuclease PH, na presença dos efetores ATP, ADP e 2-OG de *Azospirillum brasilense*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nitrogênio

Os procariotos apresentam grande diversidade metabólica, o que favorece a capacidade de se adaptarem ao meio, principalmente quando há limitação de algum nutriente. Conseqüentemente, as bactérias desenvolveram diversas formas de assimilar diferentes nutrientes, principalmente carbono e o nitrogênio. O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes, pois está presente na estrutura de diversas moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, moléculas de vital importância para as células (DIXON; KAHN, 2004; HOFFMAN *et al.*, 2014)

O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante na biomassa celular e está presente na atmosfera, representando 80% de sua composição (STEIN; KLOTZ, 2016). Apesar de abundante, o nitrogênio atmosférico está na forma de gás dinitrogênio, que devido à ligação tripla entre os átomos de nitrogênio, é bastante inerte e pouco reativo (MACKAY; FRYZUK, 2004; JIA; QUADRELLI, 2013). O gás dinitrogênio pode ser convertido em formas mais reduzidas, por meio de processos abióticos como descargas elétricas (raios), por meio de técnicas industriais como a reação de Haber-Bosch, ou ainda por processos bióticos pela ação de microrganismos (STEIN, KLOTZ, 2016).

Os diazotróficos são microrganismos capazes de reduzir o gás dinitrogênio a amônia. Existem diversos gêneros que possuem espécies diazotróficas, como *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, etc (POSTGATE, 1982).

2.2. Organismos fixadores de nitrogênio: gênero *Azospirillum*

Azospirillum é um gênero que faz parte da divisão das alfa –proteobactérias (YOUNG, 1992). Esse gênero possui 21 espécies descritas, sendo elas: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. amazonense* (MAGALHAES *et al.*, 1983), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (DERKHIL *et al.*, 1997), *A. doebereinae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE, YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007a), *A. zae* (MEHNAZ *et al.*, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *A. palatum* (ZHOU *et al.*,

2009), *A. picis* (LIN *et al.*, 2009), *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010), *A. formosense* (LIN *et al.*, 2012), *A. humicireducens* (ZHOU *et al.*, 2013) *A. fermentarium* (LIN *et al.*, 2013) *A. himalayense* (TYAGI; SINGH, 2014), *A. soli* (LIN *et al.*, 2015) *A. agricola* (LIN *et al.*, 2016).

Azospirillum spp. são bactérias de vida livre, gram negativas, curvas, móveis, aeróbicas e de várias origens geográficas (ECKERT *et al.*, 2001). Possuem um metabolismo versátil de carbono e nitrogênio, podendo utilizar como fonte de carbono, D-glucose e D-frutose, ácidos orgânicos, como malato, lactato, succinato e piruvato, e como fonte de nitrogênio, amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos e dinitrogênio (DOBEREINER; PEDROSA, 1987; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Os membros do gênero *Azospirillum* foram considerados importantes entre as rizobactérias de promoção do crescimento de plantas e reconhecidos como biofertilizantes (LIN *et al.*, 2016). Vessey (2003) define biofertilizante como substância que contém microrganismos vivos, podendo ser aplicado a sementes, superfície de plantas ou solo, que coloniza a rizosfera ou o interior da planta, promovendo o crescimento pelo aumento da biodisponibilidade de nutrientes primários para a planta hospedeira. As principais vantagens do uso de biofertilizantes segundo El-Latiff (2016) são: diminuem o uso de fertilizantes químicos e conseqüente redução da poluição ambiental, aumentam a concentração de nutrientes de fácil assimilação, aumentam a excreção de substâncias de promoção do crescimento de plantas, melhoram as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e a excreção de antibióticos que protegem as plantas.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são geralmente encontradas na rizosfera, colonizando a superfície radicular, ou mesmo no interior da raiz (PATRIQUIN *et al.*, 1983; DÖBEREINER *et al.*, 1995; STEENHOUDT, VANDERLEYDEN, 2000), podendo ser encontrados em associação com diversas plantas, incluindo espécies de interesse econômico como trigo, milho, sorgo e arroz (DOBEREINER, DAY, 1976; DOBEREINER, 1992). Bactérias do gênero *Azospirillum* podem influenciar positivamente o crescimento da planta, a produtividade, o conteúdo de nitrogênio (STEENHOUDT, VANDERLEYDEN, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2016), além de diminuir o estresse osmótico, principalmente em cultivos hidropônicos (CASSÁN *et al.*, 2009). O uso de *A. brasilense* como biofertilizantes foi aprovado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2.3. Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio é realizada por meio da enzima nitrogenase (EADY, 1986; SMITH, 2000). As nitrogenases são enzimas complexas e possuem estrutura e mecanismos conservados. A forma mais usual da nitrogenase é constituída por duas metaloproteínas, a proteína Fe (Dinitrogenase redutase ou NifH) e a proteína Fe-Mo (dinitrogenase ou NifDK). A proteína Fe desempenha a função de doadora de elétrons dependente de ATP, possui uma estrutura dimerica γ_2 , que contém um centro 4Fe-4S. Esta transporta elétrons para a proteína Fe-Mo, que possui o sítio catalítico. A proteína Fe-Mo, é um tetrâmero, $\alpha_2\beta_2$, que possui dois centros P (8Fe-7S) e dois centros Fe-Mo (MoFe₇S₉. Homocitrato) (DIXON, KHAN, 2004; LUKOYANOV *et al.*, 2012).

A reação catalisada pela nitrogenase, de N₂ a amônio, precisa de condições ideais para acontecer, como a ausência de oxigênio e de fontes mais fáceis de assimilação de nitrogênio, além de fonte de energia disponível. A estequiometria da reação da nitrogenase é a seguinte (EADY 1996):



Devido a esses fatores e ao gasto de energia (16 moléculas de ATP por molécula de N₂ fixada) o processo de fixação de nitrogênio pela nitrogenase é altamente regulado. Em algumas Proteobactérias, essa regulação pode ocorrer tanto a nível transcricional dos genes *nif*, controlados pelo sistema Ntr, quanto a nível pós-traducional, regulado principalmente pelas proteínas PII (DIXON, KAHN, 2004).

Após a conversão de dinitrogênio a amônio, o amônio é incorporado em glutamina ou glutamato, os quais serviram de doadores de nitrogênio para outras reações, principalmente para reações de transaminação e transamidação, levando à síntese de outros aminoácidos e precursores para biossíntese de purinas e pirimidinas (HEESWIJK *et al.*, 2013). A assimilação de amônio pode ocorrer por duas vias, GDH (glutamato desidrogenase) ou a via GS-GOGAT (glutamina sintetase e glutamato sintetase) sendo que a última tem o gasto de uma molécula de ATP por molécula de amônio assimilada (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001) (Figura 1).

A GS de *E. coli* tem um K_M (Constante de Michaelis-Menten) relativamente baixo para amônio (aproximadamente 0,1 mM) quando comparado a GDH (aproximadamente 1 mM), o que significa que GS possui maior afinidade por amônio (MERRICK, EDWARDS, 1995; HEESWIJK *et al.*, 2013).

A GS é uma proteína de 12 subunidades, de aproximadamente 55 kDa cada, que converte glutamato e amônia em glutamina. A GOGAT, possui duas subunidades, GltB e GltD, de massa 53 kDa e 135 kDa, respectivamente, e sintetiza glutamato a partir de glutamina e 2-oxoglutarato (Figura 1) (GOSS *et al.*, 2001; HEESWIJK *et al.*, 2013).

Em *E. coli*, a atividade de GS é regulada por diversas estratégias. A nível de substrato é regulada positivamente por amônio e glutamato, sofre *feedback* negativo pelo produto, glutamina, e é regulada também pelo estado redox da célula por meio de NADPH e pelo estado energético celular por meio do ATP, além de sofrer modificação covalente catalisada pela enzima adenilil transferase, também conhecida como GlnE ou ATase (HIREL *et al.*, 1987; STREICHER *et al.*, 1974; ARCONDÉGUY *et al.*, 2001)

A ATase de *E. coli* realiza a adenililação e desadenililação da GS em resposta as proteínas PII, interagindo com elas tanto em sua forma uridililada quanto desuridililada (JIANG *et al.*, 2007). Em *Azospirillum brasilense*, a regulação de GS pela ATase parece ser independente de PII (HUERGO *et al.*, 2006).

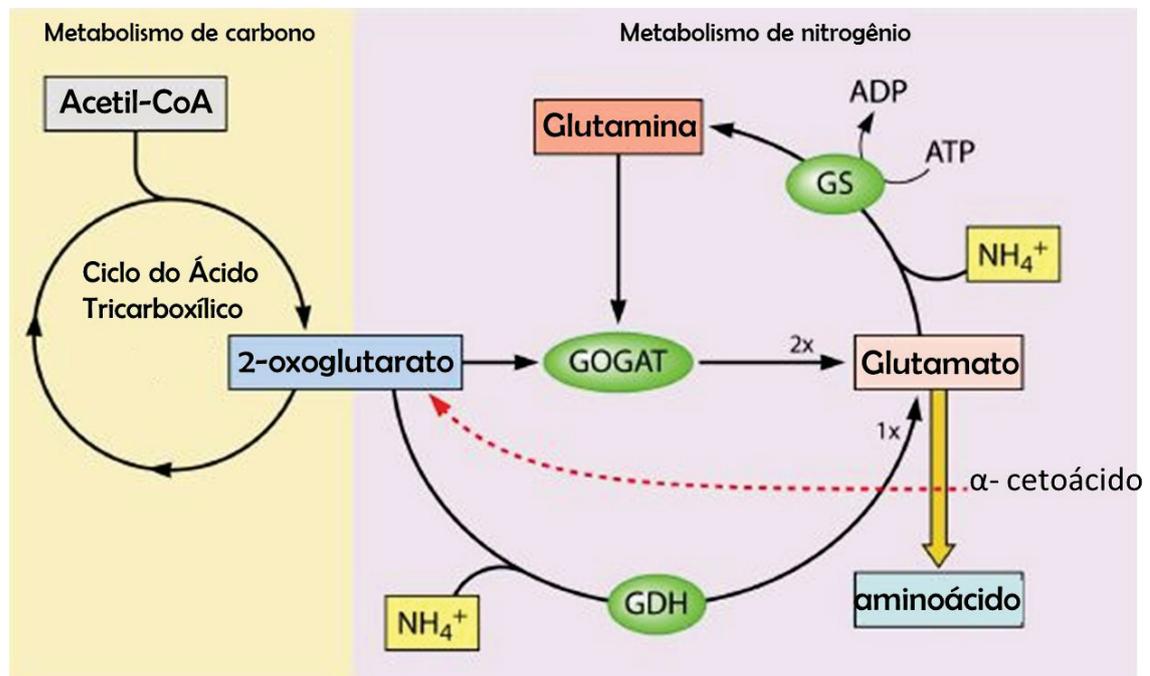


Figura 1. Vias de assimilação de amônio em *Escherichia coli*. Em ambas as vias o 2-oxoglutarato é utilizado como precursor para a produção da molécula de glutamato. O 2-OG é intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, altas concentrações sugerem suficiência de carbono, assim como sugerem limitação de nitrogênio, pois o mesmo é acumulado, visto que na ausência de amônio, não há assimilação de nitrogênio. O contrário também é verdadeiro, baixos níveis de 2-OG indicam suficiência de amônio, pois o mesmo está sendo utilizado nas vias de assimilação. A assimilação de amônio pela via GS/GOGAT produz 2 moléculas de glutamato (simbolizado por “2x”), e a via GDH produz uma molécula de glutamato (simbolizado por “1x”). Fonte: adaptado de Huergo *et al.*, (2015).

Para organismos fixadores, como *A. brasilense*, todo o processo de fixação de nitrogênio até a assimilação do mesmo em glutamina ou glutamato é dispendioso e extremamente importante para a célula, portanto o mesmo precisa ser bem regulado para que não ocorra gastos desnecessários de energia. As principais responsáveis pela regulação deste metabolismo são as proteínas PII.

2.4. Proteínas PII

As proteínas PII constituem uma família de proteínas sinalizadoras amplamente distribuídas entre as bactérias, arqueas, cianobactérias e cloroplastos de plantas (NINFA; ATKINSON, 2000). São capazes de sensoriar os níveis de nitrogênio, carbono e energia da célula pela ligação a efetores, ATP, ADP e 2-oxoglutarato, metabólito que também faz parte do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ARCONDEGUY, 2001; NINFA, JIANG, 2005). As proteínas PII são responsáveis pela regulação de diversas proteínas, principalmente no metabolismo de nitrogênio, incluindo fixação e assimilação de nitrogênio, processos esses que são dispendiosos para a célula e de extrema importância na adaptação a condições de deficiência nutricional (MERRICK, EDWARDS, 1995; FORCHHAMMER, LÜDDECKE, 2016).

As proteínas PII foram descritas pela primeira vez em 1969, em um trabalho sobre a regulação da enzima GS. Em uma coluna de gel filtração, apareceram dois picos, chamados de PI e PII que estavam envolvidos na regulação da GS por adenililação reversível (SHAPIRO, 1969). PI era responsável pela adenililação/desadenililação de GS (posteriormente denominada ATase), e PII regulava essa atividade (BROWN *et al.*, 1971).

PII apresenta estrutura conservada e amplamente distribuída entre diversos microrganismos e cloroplastos de plantas, e podem ser classificadas em três grupos, GlnB, GlnK e NifI de acordo com a organização dos respectivos genes. O gene *glnB* geralmente é monocistônico ou está relacionado com os genes *glnA* (glutamina sintetase) e *nadE* (NAD sintetase dependente de glutamina). Em *E. coli*, o gene de *glnK* está no mesmo operon, e é co-expresso com o gene *amtB* que codifica para um transportador de amônio. E por último a NifI que é exclusiva de algumas arqueas metanogênicas e está relacionada com a regulação do “switch off” da nitrogenase (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

Um novo grupo de proteínas PII foi sugerido por Sant’Anna e colaboradores (2009), que por meio de análises de bioinformática demonstraram a presença de proteínas com motivos idênticos aos de proteínas PII já conhecidas, porém relacionadas com genes de transporte de metais, o que sugere uma possível função nova de PII na homeostase desses metais. Esse novo grupo de PII foi nomeado PII *new group* (PII-NG).

Em *Azospirillum brasilense* os genes *glnB* e *glnA* estão no mesmo operon, e são co-transcritos em altos níveis quando na ausência de amônio a partir de um promotor dependente de sigma 54. Uma expressão mais baixa foi observada em baixos níveis de amônio a partir de

um promotor dependente de sigma 70 (ZAMAROCZY *et al.*, 1990; ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Em *A. brasilense* existe uma segunda proteína PII, denominada GlnZ, produto do gene *glnZ*, que é um gene monocistrônico (DE ZAMAROCZY, 1998).

Em *E. coli*, duas proteínas PII são encontradas, GlnB e GlnK, que são estruturalmente muito semelhantes (XU *et al.*, 1998). Essas proteínas tem estrutura homotrimérica, e cada monômero apresenta massa de 12 a 13 kDa, arranjada na forma de cilindro curto. A estrutura tridimensional das proteínas PII é altamente conservada (FORCHHAMMER, 2004). Cada monômero de uma proteína PII apresenta duas α -hélices e seis folhas- β formando um duplo motivo $\beta\alpha\beta$ conectado por uma alça que, em seu ápice, apresenta um resíduo de tirosina 51, e por isso é conhecido como alça T ou *loop* T. A alça T, mostrada na Figura 2 é flexível e é onde ocorre a maioria das interações já descritas entre PII e outras proteínas, como a adenililtransferase, uridililtransferase e a proteína histidina quinase, NtrB (HUERGO *et al.*, 2012).

Uma segunda alça menor é formada pela separação da segunda α -hélice e a quarta folha- β , chamado de alça B ou *loop* B. Ainda há uma terceira alça formada na região C-terminal chamado alça C ou *loop* C (CARR *et al.*, 1996; ARCONDEGUY, 2001).

Os trímeros de PII são arranjados de uma maneira que a folha- β -4 de um monômero ficam flanqueadas pela alça-T do segundo monômero, e o outro lado, fica flanqueado pela alça-C, do terceiro monômero. Essa disposição dos monômeros no trímero forma uma fenda, de grande importância funcional, visto que é nela que se ligam os efetores. Três folhas- β antiparalelas estão arranjadas em superfície côncava no centro do trímero, porém a maior parte da proteína está arranjada no formato de barril de 30 Å de altura. Cada monômero está arranjado de forma a expor um trecho de 8 resíduos de aminoácidos, que contêm o resíduo Tyr51, exposto ao solvente (CHEAH *et al.*, 1994; CARR *et al.*, 1996; ARCONDEGUY, 2001).

2.4.1. Modificações Pós-Traducionais em PII

As proteínas PII controlam a atividade de inúmeras enzimas, fatores de transcrição, transportadores de membrana, entre outros alvos, pela interação proteína-proteína, de acordo com os níveis de amônio intracelular (MERRICK, 2015). Em Proteobacteria, quando em limitação de amônio, as proteínas PII são rapidamente uridililadas, ou seja, sofrem a adição de um grupo UMP, e essa modificação afeta a capacidade de PII de interagir com diversos alvos,

como por exemplo, o transportador de amônio AmtB e o fator de transcrição NtrB (ARCONDEGUY *et al.*, 2001; NINFA, ATKINSON, 2000; DIXON, KHAN, 2004).

A modificação pós-traducional das proteínas PII por uridililação foi observada primeiramente em *E. coli*. Essa modificação ocorre no resíduo Tyr51 da alça T (Figura 2). Tanto a uridililação, que ocorre em baixos níveis de amônio, quanto a desuridililação, que ocorre em altos níveis de amônio, são realizadas pela mesma enzima, uma enzima bifuncional denominada GlnD (ADLER *et al.*, 1975; FRANCIS; ENGLEMAN, 1978).

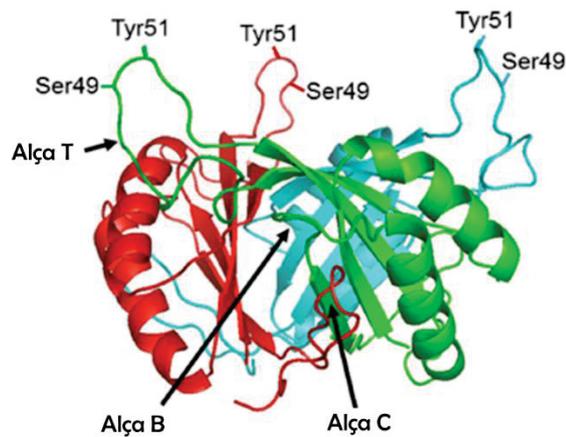


Figura 2. Sítios de modificações pós traducionais em proteínas PII. Visão lateral da proteína GlnB de *Escherichia coli* na ausência de ligantes, mostrando a localização das três alças, T, B e C e os resíduos de aminoácidos que recebem a ligação de um grupo UMP, AMP ou fosfato. Fonte: adaptado de Merrick, 2015.

Em *Escherichia coli* e outras proteobacterias, GlnD sensoria os níveis de amônio intracelular pela ligação a glutamina (JIANG *et al.*, 1998). GlnD apresenta 4 domínios: um domínio N terminal nucleotidiltransferase (NT), que possui a atividade de uridililtransferase (UT), um domínio central (HD), responsável pela atividade de desuridililação (UR) e dois domínios C-terminais (ACT), prováveis domínios de ligação a glutamina (ZHANG *et al.*, 2010).

Em *Actinobacteria*, GlnD adenilila ao invés de uridililar o resíduo Tyr51, quando em condições limitantes de amônio (HESKETH *et al.*, 2002). Em cianobactérias ocorre a fosforilação do resíduo de serina, Ser49, presente também na alça T das proteínas PII de cianobactérias (FORCHHAMMER; MARSAC, 1994) (Figura 2). Já as PII de plantas não apresentam modificações pós-traducionais, porém apresentam uma extensão na extremidade C-terminal, denominada alça Q, que sensoria diretamente os níveis de nitrogênio pela ligação a glutamina (CHELLAMUTHU *et al.*, 2014).

GlnD já foi caracterizada em diversos organismos, incluindo *A. brasilense* (ARAÚJO *et al.*, 2008), onde possui a mesma função descrita em *E. coli*, sensoriando os níveis de nitrogênio por meio da ligação a glutamina, e uridililando/desuridililando ambas as proteínas PII, GlnZ e GlnB. Sabe-se que nesse organismo para que ocorra a uridililação é necessário a ligação de Mg.ATP e 2-OG à PII (GERHARDT *et al.*, 2012). Além das modificações covalentes sofridas por PII, essas proteínas podem ligar efetores, como ATP, ADP e 2-OG. A regulação da atividade dessas proteínas por meio da ligação desses efetores é uma das funções mais conservadas de sensoriamento dessas proteínas (ARCONDEGUY, 2001; HUERGO *et al.*, 2012).

2.4.2. Ligação a efetores

Uma das funções mais conhecidas, estudadas e conservadas das proteínas PII é a ligação de efetores (ARCONDEGUY, 2001; FORCHHAMMER, 2004; HUERGO *et al.*, 2012). Esses efetores, ATP, ADP e 2-OG, se ligam nas fendas laterais entre os monômeros, localizado na base da alça T. Em geral, ATP e ADP competem pelo mesmo sítio de ligação as proteínas PII, enquanto 2-OG se liga somente na presença de ATP.Mg. A ligação dos efetores altera a estrutura da alça T, principal responsável pela interação proteína-proteína, modulando assim a ligação das proteínas PII a possíveis alvos (TRUAN *et al.*, 2010).

As proteínas PII apresentam três sítios de ligação a efetores, que são independentes e podem estar ligados a cada um dos três efetores ao mesmo tempo (RADCHENKO *et al.*, 2010). As relações entre as ligações desses efetores não é universal (HUERGO *et al.*, 2012). Em *E. coli*, ATP e ADP competem pelo mesmo sítio de ligação, e a ligação de ATP e 2-OG apresenta sinergismo, enquanto que ADP tem cooperatividade negativa com 2-OG (JIANG *et al.*, 2007). Em *A. brasilense* nenhum efeito de cooperatividade foi detectado, entretanto o sinergismo entre ATP e 2-OG sim. Além disso, 2-OG não é capaz de ligar a PII na ausência de Mg^{+2} (TRUAN *et al.*, 2014). Outras proteínas PII, como da arquea *Archaeoglobus fulgidus* (HELFMANN *et al.*, 2010) e a briófito *Physcomitrella patens* (LAPINA *et al.*, 2018) não ligam 2-OG.

Devido ao fato das proteínas PII ligarem ATP e ADP, elas sensoriam a taxa ATP/ADP intracelular, ou seja, o balanço energético da célula. Além disso, para algumas proteínas PII, incluindo GlnB e GlnZ de *A. brasilense*, os níveis de 2-OG têm um papel determinante na ligação de nucleotídeos às proteínas PII. Isto ocorre devido ao sinergismo entre ligação de 2-OG e ATP e antagonismo entre ligação de 2-OG e ADP. O efeito sinérgico entre ATP e 2-

OG é decorrente da necessidade de ocupação de PII por Mg.ATP para formação do sítio de ligação de 2-OG, como pode ser observado na estrutura cristalográfica da proteína GlnZ (Figura 3) (TRUAN *et al.*, 2010; GERHARDT *et al.*, 2012).

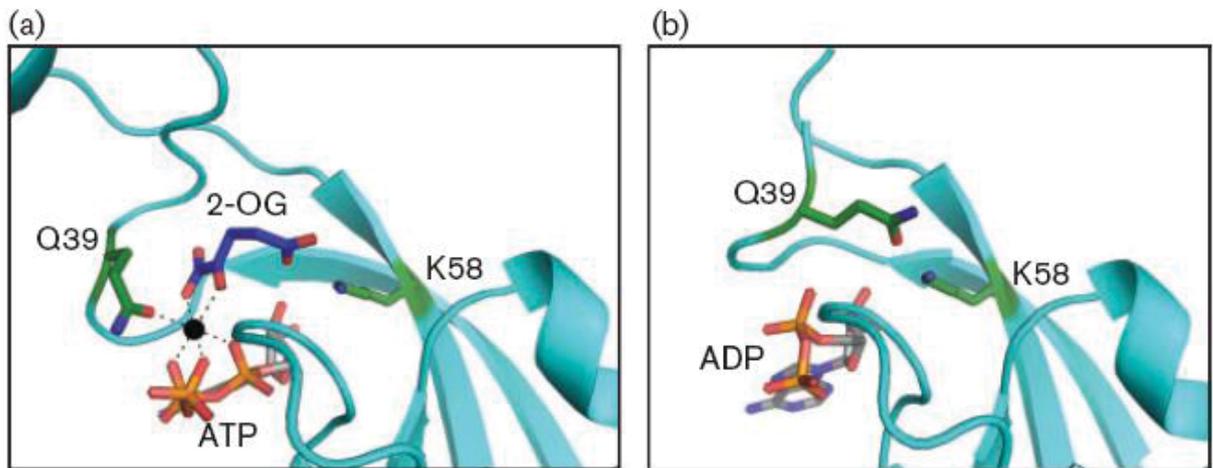


Figura 3. Sítio de ligação a ATP, ADP e 2-OG em GlnZ de *Azospirillum brasilense*. Em (a) GlnZ ligada a Mg.ATP e 2-OG e em (b) ligada ao ADP. Em azul está representado o monômero de GlnZ, em azul escura está representado o 2-OG, a esfera em preto representa o íon Mg^{+2} e as linhas pontilhadas representam sua coordenação com resíduos de GlnZ e o 2-OG. Na ligação ao ADP está mostrado em verde os resíduos que interagem Q39 e K58. (PDB 3MHY). Fonte: Gerhardt *et al.* (2012).

Em Proteobacteria acredita-se que em situação de limitação de amônio, os níveis de 2-OG são altos, e as PII estão principalmente ocupadas por Mg.ATP + 2-OG. Quando os níveis de 2-OG diminuem pelo aumento da concentração de amônio, a afinidade de ligação ao ATP diminui e por ADP aumenta favorecendo a ocupação de PII por ADP (TRUAN *et al.*, 2010; RADCHENKO *et al.*, 2010).

Estudos com GlnB de *E. coli* demonstram que quando ATP está em condições saturantes, a *Kd* do 2-OG, após a ligação da primeira molécula no primeiro sítio, aumenta de μM a 1-2 ordens de magnitude, demonstrando alta anticooperatividade (JIANG *et al.*, 1998). A anticooperatividade na ligação do 2-OG em PII favorece a capacidade de responder a faixa de concentrações fisiológicas através da ligação de 1, 2 ou 3 moléculas de 2-OG (JIANG; NINFA, 2009). O 2-OG é considerado um sinalizador de suficiência de carbono, por estar presente no ciclo dos ácidos tricarbônicos. Este metabolito também sinaliza níveis de nitrogênio, pois é usado como esqueleto carbônico durante a assimilação de amônio. Assim, as proteínas PII são capazes de sensoriar a disponibilidade de nitrogênio, carbono e energia, integrando os sinais dos níveis de 2-OG, glutamina, ATP e ADP (COMMICHAU *et al.*, 2006).

2-oxoglutarato (2-OG) é um metabólito chave no metabolismo por participar tanto do metabolismo de carbono quanto do metabolismo de nitrogênio (Figura 1). Por participar da assimilação do amônio, os níveis intracelulares de 2-OG variam em relação ao nitrogênio disponível. Estudos em *E. coli* tem demonstrado que quando em altas concentrações de amônio, as concentrações de 2-OG são baixas (REYES-RAMIREZ *et al.*, 2001) e após um intervalo de tempo (entre 3 e 15 min) as concentrações de 2-OG voltam ao nível basal, quando o amônio já foi consumido. A concentração de 2-OG intracelular variam de 0,3mM quando na presença de amônio, até 2,5 mM, na ausência de amônio (YUAN *et al.*, 2009; RADCHENKO *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2011). Porém os níveis de 2-OG podem variar também em relação ao carbono disponível, onde a diminuição da fonte de carbono leva a diminuição da concentração de 2-OG (YAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

2-OG parece ser o ponto convergente entre os metabolismos de carbono e nitrogênio, e as proteínas PII, por ligarem 2-OG, estariam sensoriando os níveis de Carbono/Nitrogênio, avaliando não só a situação energética da célula por meio da ligação a ATP/ADP, mas também a disponibilidade de esqueleto carbônico disponível para a fixação de nitrogênio (HUERGO *et al.*, 2015). Com a descoberta da participação da PII na regulação de uma das principais enzimas relacionadas ao metabolismo de carbono, a Acetil-CoA carboxilase (ACC), o papel do 2-OG se tornou ainda mais importante (GERHARDT *et al.*, 2015).

2.4.3. Papel das proteínas PII como reguladoras da fixação biológica de nitrogênio

As funções de PII foram principalmente descritas no metabolismo de nitrogênio e entre os alvos mais conhecidos de PII, estão o transportador de amônio AmtB, componentes do sistema Ntr que regulam a transcrição dos genes *nif*, NifA e NtrB, as proteínas DraT/DraG responsáveis pela atividade de “Switch off” da nitrogenase, ATase, responsável pela adenililação das subunidades da enzima GS e NAGK, enzima relacionada a síntese de arginina.

A GS pode ter suas subunidades adenililadas separadamente, tendo sua atividade modulada finamente em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular (GOSS *et al.*, 2001). A proteína responsável pela adenililação de GS é a GlnE (ATase), que é bifuncional, e atua adenililando GS com a adição de grupos AMP usando ATP como substrato, ou desadenililando, liberando ADP (MERRICK; EDWARDS, 1995).

Em *E. coli*, GlnB controla o estado de adenililação de GS por regular a atividade de GlnE por interação direta, em resposta a glutamina. Em condições de suficiência de nitrogênio

a concentração de glutamina aumenta, GlnB desuridilada interage com GlnE ativando sua função AT, adenilando as subunidades de GS, tornando esta última menos ativa (NINFA e ATKINSON, 2000; REITZER, 2003; NINFA, JIANG, 2005).

Em situação de limitação de amônio a concentração de glutamina diminui, e a atividade de UT de GlnD é ativada, ocorrendo então a uridililação de GlnB. GlnB-UMP₃ interage com GlnE, ativando a sua função de AR e catalisando a desadenililação das subunidades de GS, tornando-a mais ativa (NINFA, ATKINSON, 2000; REITZER, 2003; NINFA, JIANG, 2005).

GlnE apresenta dois domínios nucleotidiltransferase (NT) homólogos, separados por um *linker*; um é responsável pela atividade de AT e outro pela atividade de AR (JIANG, NINFA, 2007). Ainda não se sabe com certeza se algum dos domínios liga GlnB competitivamente ou se existem dois sítios de ligação diferentes para GlnB e GlnB-UMP₃ (HUERGO *et al.*, 2013).

A interação entre GlnE e a proteína GlnB é uma das mais bem caracterizadas funções de PII, e foi observada em *E. coli*. Em *A. brasilense* nenhuma das PII parece afetar a atividade de GS (DE ZAMAROCZY, 1998), e assim como em outros organismos que também não possuem regulação de GS por PII, é proposto que nesses casos GS seja regulada somente pela concentração de glutamina (HUERGO *et al.*, 2013).

Em *A. brasilense* as duas proteínas PII, GlnB e GlnZ apresentam 81% de similaridade (ZAMAROCZY, 1998) mas desempenham funções diferentes. AbGlnB regula a atividade de NifA, que é uma proteína membro da família EBP (do inglês *enhancer binding protein*) capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* (DIXON, KAHN, 2004). GlnB interage com o domínio GAF de NifA, em condições de limitação de nitrogênio, ativando esta proteína (ZAMAROCZY *et al.*, 1993; ARSENE *et al.*, 1996).

Em muitos diazotróficos, GlnB regula ainda a atividade de NtrBC, um sistema de dois componentes que faz parte de uma cascata regulatória da expressão da nitrogenase por meio da transcrição dos genes *nif*, genes envolvidos na estrutura, função, atividade e manutenção do complexo da nitrogenase (ARCONDEGUY *et al.*, 2001; DIXON, KAHN, 2004). Em condições de privação de amônio, a concentração de glutamina diminui ativando a função UT de GlnD, uridilando as proteínas PII. Nessa situação GlnB não interage com NtrB e o mesmo se autofosforila e é capaz de fosforilar o segundo componente, NtrC, que por sua vez, quando fosforilado, ativa a transcrição dos genes *nif* (KAMBEROV *et al.*, 1995; NINFA, 1996; DIXON, KHAN, 2004).

A proteína PII de *E. coli* GlnK, paróloga a GlnB, é co-expressa com o transportador de amônio, AmtB. A família de transportador AmtB é amplamente distribuída entre bactérias, arqueas, fungos e plantas (WIRÉN; MERRICK, 2004), e apresentam estrutura homotrímica,

sendo que cada subunidade apresenta de 11 a 12 hélices transmembrana, formando um único canal (KHADEMI *et al.*, 2004). Durante a interação de PII com AmtB, a alça T de GlnK bloqueia o canal de amônio/amônia de AmtB, fechando-o fisicamente (CONROY *et al.*, 2007). A regulação de AmtB por GlnK é diretamente relacionada com o nível de amônio intracelular. O transporte de amônio não é requerido em condições de excesso de do mesmo, porque a molécula entra por difusão na célula, porém em condições de privação o transporte torna-se funcional pelo desligamento da proteína PII, que antes impedia fisicamente o canal (COUTTS *et al.*, 2002). Nesta condição, GlnK encontra-se uridililada no citosol (RADCHENKO *et al.*, 2010). Porém, quando ocorre o aumento da concentração de amônio sinalizada pelo aumento de glutamina e diminuição do 2-OG, GlnK encontra-se com os três sítios saturados por ADP, favorecendo a interação com AmtB (RADCHENKO *et al.*, 2010; HUERGO *et al.*, 2012).

Outros alvos de PII são as proteínas DraT e DraG (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase e dinitrogenase redutase glicohidrolase). Em condições de fixação de nitrogênio, quando GlnZ e GlnB estão uridililadas e ligadas a Mg.ATP e 2-OG, DraG e DraT estão livres no citosol, DraG se encontra ativa e DraT, inativa, logo NifH será ativada pela remoção dos grupos ADP-riboses por DraG. Quando em condições de suficiência de nitrogênio, as proteínas PII estão desuridililadas e ligadas ao ADP, então GlnZ interage com DraG e AmtB, formando um complexo ternário ligado a membrana. Por outro lado, GlnB desuridililada interage com DraT ativando-a e DraT ativa irá ADP-ribosilar a subunidade NifH da nitrogenase, inativando-a (HUERGO *et al.*, 2009).

Outra interação bem descrita de PII é sua interação com NAGK. A interação de NAGK (N-acetil-L-glutamato quinase) e GlnB foi descrita em *Synechococcus elongatus* (HEINRICH *et al.*, 2006), *Arabidopsis thaliana* (CHEN *et al.*, 2006) e *Oryza sativa* (SUGIYAMA *et al.*, 2004). NAGK tem estrutura de anel hexamérico (LLÁCER *et al.*, 2007), sendo a enzima da via de biossíntese de arginina que catalisa a reação de comprometimento da via (CALDOVIC; TUCHMAN, 2003). Em cianobactérias e plantas, a arginina gerada nas vias de biossíntese não é apenas utilizada para a produção de novas proteínas, mas também como reserva de nitrogênio (MAHESWARAN *et al.*, 2006).

Em condições de limitação de nitrogênio, quando a concentração de 2-OG aumenta, ou condições de pouca energia, quando as concentrações de ADP aumentam, PII e NAGK não formam complexo, diminuindo a atividade de NAGK pelo aumento da sensibilidade a arginina (*feedback* negativo pelo produto da via). Quando em condições de suficiência de nitrogênio e energia, os níveis de 2-OG e ADP estarão baixos, e então PII-NAGK formam um complexo que remove a regulação por *feedback* negativo por arginina, tornando NAGK mais ativa. Dessa

forma, a produção de arginina aumenta e parte dela é desviada para as vias de armazenamento de nitrogênio (MAHESWARAN *et al.*, 2004; MAHESWARAN *et al.*, 2006; FORCHHAMMER, 2008).

A cada ano, novas descobertas têm sido realizadas e novos alvos das proteínas PII estão sendo conhecidos e caracterizados (HUERGO *et al.*, 2013).

2.4.4. Outras proteínas alvos de PII

Acetil-CoA Carboxilase (ACC) é a enzima responsável pela produção de malonil-CoA a partir de Acetil-CoA. Malonil-CoA é o iniciador da síntese de ácidos graxos de cadeia longa (CRONAN; WALDROP, 2002). A ACC foi a primeira proteína descoberta que interage com PII e não faz parte do metabolismo de nitrogênio. A interação entre PII e ACC foi descrita primeiramente em *Arabidopsis thaliana* (BOURRELLIER *et al.*, 2010) e mais tarde, por Rodrigues e colaboradores (2014) foi verificada essa interação também para as PII de *E. coli*, *A. brasilense* (GERHARDT *et al.*, 2015) e *S. elongatus* (HAUF *et al.*, 2016). A interação de PII com uma proteína relacionada ao metabolismo de carbono abriu a discussão sobre qual é a real função dessas proteínas e quais alvos ainda não foram descobertos.

Em busca de possíveis alvos de PII, Gerhardt (2015) realizou um ensaio com a proteína His-GlnZ de *A. brasilense* imobilizadas em coluna de níquel, e extrato de *A. brasilense* 2812 (GlnB⁻, GlnZ⁻). Como as proteínas PII ligam efetores, os ensaios foram realizados na presença de ADP ou ATP, e a eluição para ambos os ensaios foi realizada na presença de ATP e 2-OG, isso porque a ligação de 2-OG causa maior mudança estrutural na alça T, o que provocaria o desligamento de proteínas ligadas às PII, ocorrendo então a eluição das mesmas. Esses ensaios geraram uma lista de possíveis proteínas que interagem com a proteína GlnZ de *A. brasilense* (GERHARDT, 2015). Dentre as proteínas identificadas estão algumas envolvidas na síntese de nucleotídeos e também no metabolismo de RNA.

2.5. Via de Síntese “De novo” de Pirimidinas

Pirimidinas são bases nitrogenadas produzidas a partir do anel pirimídico. São a base de formação da citosina, uracila e timina. Os nucleotídeos são substratos para a produção de RNA e DNA e são utilizados como doadores de energia para os processos celulares (KILSTRUP *et al.*, 2005).

A síntese “de novo” de pirimidinas se refere a produção realizada a partir de HCO_3^- + ATP + glutamina formando carbamoil fosfato pela enzima Carbamoil fosfato sintetase (CPS). O UMP é o produto dessa via e, a partir dele, são produzidas as pirimidinas TTP, UTP e CTP (HOVE-JENSEN, 1989). A sequência de passos da via “de novo” é conservada entre plantas, animais e microrganismos (O’DONOVAN; NEUHARD, 1970; WAGNER, BAKER, 1992).

A produção de UMP ocorre em seis reações catalisadas por seis enzimas (Fig. 4), são elas: Carbamoil fosfato sintetase (CPS), produto do gene *carAB*, Aspartato transcarbamoilase (*pyrBI*), Dihidroorotase (*pyrC*), Dihidroorotato desidrogenase (*pyrD*), Orotato fosforibosiltransferase (*pyrE*) e Orotidina 5’ -monofosfato descarboxilase (*pyrF*) (MOFFATT, ASHIHARA, 2002).

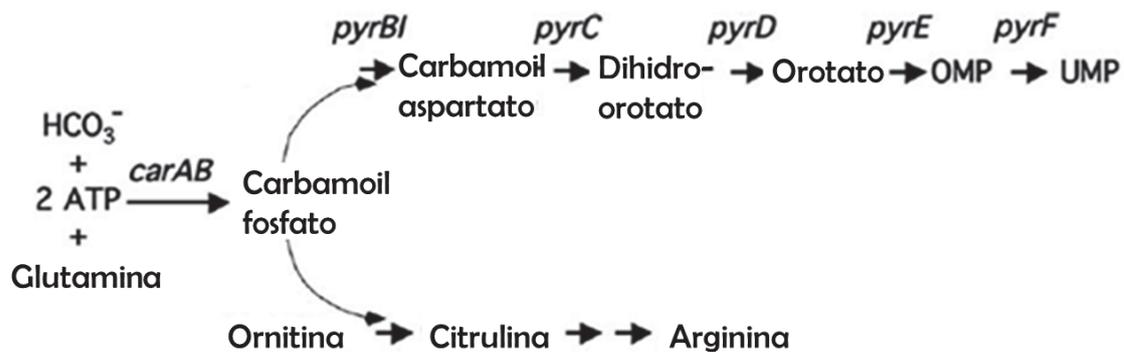


Figura 4. Primeira etapa da via de síntese “De novo” de pirimidinas em *Escherichia coli* e *Salmonella*. Em itálico os nomes dos genes (*carAB*, *pyrBI*, *pyrC*, *pyrD*, *pyrE*, *pyrF*). O gene *carAB* codifica para a enzima CPS, carbamoilfosfato sintetase, cujo produto, carbamoil fosfato pode ser utilizado na via “de novo” de pirimidinas, mostrada acima, como na via de síntese da arginina, mostrada abaixo. Em *E. coli* e *Salmonella* a regulação dessa enzima ocorre principalmente por feedback negativo dos produtos de ambas as vias. Fonte: adaptado de Turnbought e Switzer, 2008.

A enzima CPS de *E. coli*, primeira enzima da via “de novo” de pirimidinas, também é a primeira enzima da via de biossíntese de arginina (Figura 4), sendo requerida igualmente pelas duas vias (ABD-EL-AL; INGRAHAM, 1969). A atividade enzimática de CPS é controlada negativamente pela concentração de UMP e positivamente pelos níveis de ornitina e inositol monofosfato (IMP) (ANDERSON; MARVIN, 1968; ANDERSON; MEISTER, 1965). Em *Saccharomyces cerevisiae* (LARSSON; REICHARD, 1966) existem duas enzimas CPS, CPS1 e CPS2, a primeira direcionada a via de síntese “de novo” de pirimidinas e a segunda a síntese de arginina. Em mamíferos a enzima CPS faz parte de um complexo enzimático que constitui as três primeiras enzimas da via, e é expresso como um único peptídeo, conhecido como CAD (COLEMAN *et al.*, 1977).

ATCase ou aspartato transcarbamoilase (PyrB) é a segunda enzima, e é exclusiva da via de síntese “de novo” de pirimidinas (YATES; PARDEE, 1956). ATCase de *E. coli* e *Salmonella typhimurium* tem duas subunidades, uma que contém o sítio catalítico e a outra que liga os inibidores CTP, CDP e CMP (GERHART; SCHACHMAN, 1965) e o ativador ATP (GERHART; PARDEE, 1962), sendo que CTP e ATP competem pelo mesmo sítio de ligação (CHANGEUX *et al.*, 1968). A ATCase de *Pseudomonas aeruginosa* é inibida tanto por CTP quanto por UTP, enquanto de *Bacillus subtilis* não apresenta inibição (BETHELL; JONES, 1969).

Dihidroorotase (PyrC) e Dihidroorotato desidrogenase (PyrD) catalisam os dois passos seguintes, a formação do primeiro anel completo, gerando o dihidroorotato e posterior conversão do mesmo em orotato (O'DONOVAN, NEUHARD, 1970). Em *L. lactis* duas enzimas PyrD podem ser encontradas, a primeira PyrDa, dependente de fumarato, possui estrutura homodimérica (NIELSEN *et al.*, 1996), e a segunda PyrDb, dependente de NAD⁺ possui estrutura de heterotetrâmero e apresenta dois cofatores FMN, dois FAD e dois *cluster* de Fe-S ligados nesses cofatores (ROWLAND *et al.*, 1997), uma enzima bem mais complexa do que na maioria das outras bactérias. Em *E. coli* existe apenas PyrD, e é uma enzima monomérica que não apresenta cofatores em sua estrutura (ROWLAND *et al.*, 2000).

A quarta enzima da via “de novo” de pirimidinas é a orotato fosforibosiltransferase (OPRTase), objeto desse trabalho, e por isso será descrita em maiores detalhes no próximo item. A última enzima da via é a PyrF ou OMP descarboxilase, que utiliza como substrato a orotidina-5' - fosfato (OMP) descarboxilando o mesmo para a formação de uridina-5' -fosfato (UMP) com a liberação de uma molécula de CO₂. A partir desse ponto ocorre uma série de interconversões que envolvem diversas enzimas, até a produção de CTP, UTP e TTP, como mostrado na figura 5 (O'DONOVAN, NEUHARD, 1970).

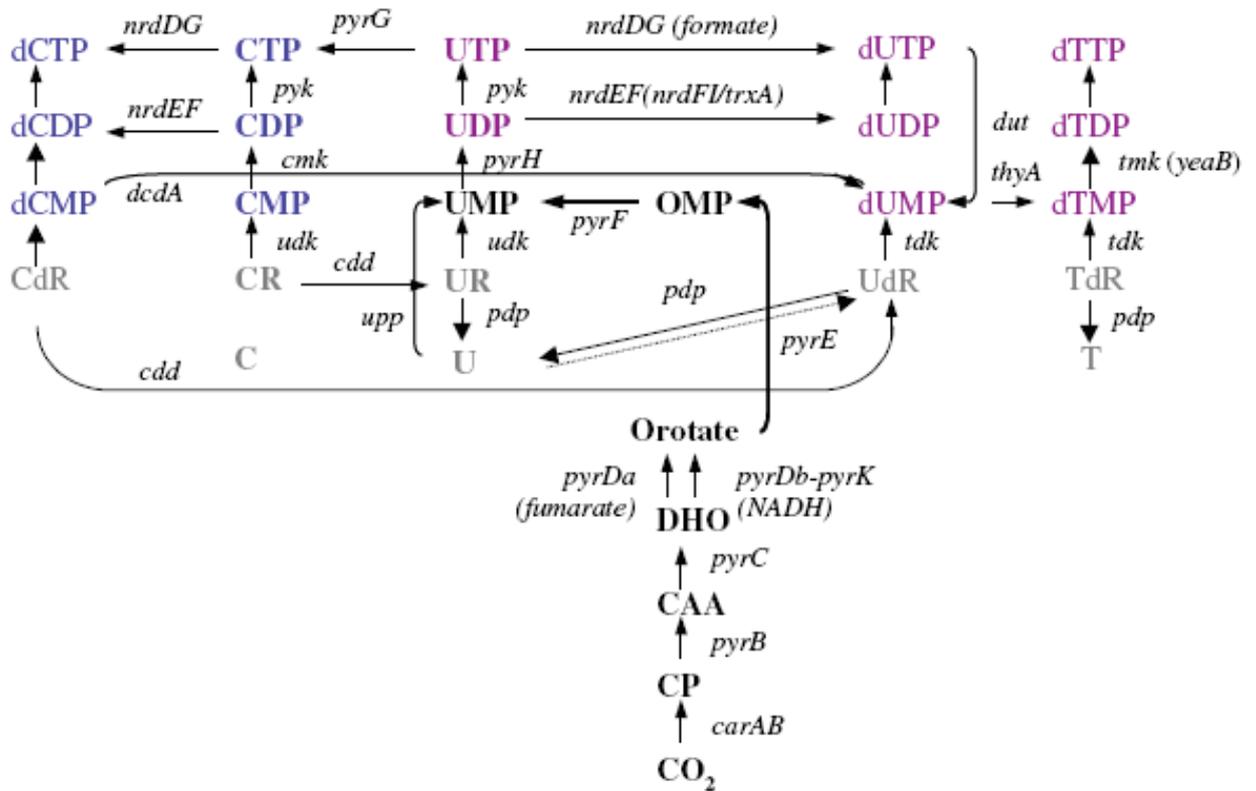


Figura 5. Via de síntese “De novo” e Salvamento de Pirimidinas em *L. lactis*. As enzimas estão representadas pelos respectivos gene, e as setas indicam a direção das reações. Seguem as abreviaturas: CP, carbamoil fosfato; CAA, carbamoil aspartato; DHO, dihidroorotato; OMP, orotato monofosfato; C, citosina; U, uracila; T, timina; CR, citidina; UR, uridina; CdR, deoxicidina; UdR, deoxiuridina; TdR, deoxitimina. Enzimas codificadas pelos genes, em ordem alfabética: carAB, carbamoil fosfato sintetase; cdd, citidina deaminase; cmk, CMP quinase; dcdA, dCMP deaminase; dut, dUTPase; nrdDG, ribonucleotídeo trifosfato redutase anaeróbica; nrdEF, ribonucleotídeo difosfato redutase; pdp, pirimidina nucleosídeo fosforilase; pyk, piruvato quinase; pyrB, aspartato transcarbamoilase; pyrC, dihidroorotase; pyrDa, dihidroorotato desidrogenase A; pyrDb/pyrK, dihidroorotato desidrogenase B; pyrE, orotato ribosilfosforilase; pyrF, OMP descarboxilase; pyrG, CTP sintetase; pyrH, UMP quinase; tdk, timidina quinase; thyA, timidilato sintetase; tmk, (d)TMP quinase; udk, uridina quinase e upp, uracil fosforilase. Fonte: Kilstrup *et al*, 2005.

Em *B. subtilis*, *L. lactis* e *B. caldolyticus* a proteína PyrR é a responsável pela regulação a nível transcricional do operon *pyr*, que possui todos os genes requeridos para a síntese de UMP. A proteína PyrR pode assumir duas conformações, tetrâmero ou dímero, e essa conformação está diretamente relacionada a não expressão ou expressão dos genes que compõem o operon *pyr*. A regulação de PyrR ocorre por meio dos metabolitos UMP, UTP e PRPP, que favorecem a conformação dimérica, que se liga a uma sequência específica na fita de RNA líder, interrompendo a transcrição dos genes. A proteína PyrR não é encontrada nas α -proteobactérias (KILSTRUP *et al.*, 2005; TURNBOUGHT, SWITZER, 2008; HOVE-JENSEN *et al.*, 2017).

2.6. OPRTases ou OMP sintases

Fosforribosiltransferase (PRTases) são enzimas relacionadas as vias de síntese de pirimidinas e purinas, via de salvação e via “de novo”, e biossíntese de histidina e triptofano (MUSICK; NYHAN, 1981). Orotato fosforribosiltransferase, OPRTase ou PyrE catalisa a reação de síntese de OMP a partir de ácido orótico e PRPP, na presença de magnésio (Figura 6).

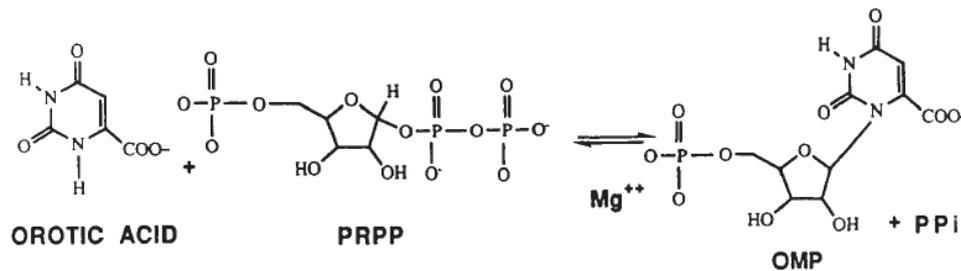


Figura 6. Reação catalisada pela OPRTase. A formação de OMP e pirofosfato a partir de ácido orótico e PRPP, na presença de magnésio. Fonte: adaptado de Bhatia *et al.*, 1990.

PyrE é codificada pelo gene *pyrE*, que em *E. coli* está localizado entre os genes *dut* e *spoT* (POULSEN *et al.*, 1983) e se encontra em um mesmo operon que o gene *rph* que codifica a Ribonuclease PH. Este operon é sensível a UTP, sendo que em baixas concentrações de UTP ambos os genes são transcritos, e quando em alta concentração, apenas o gene *rph* é transcrito. A expressão do gene *pyrE* é atenuada por uma estrutura secundária de mRNA em *E. coli* (ANDERSEN *et al.*, 1992). Em *P. aeruginosa* os genes *pyrE* e *rph* estão flanqueando o gene *crc*, responsável pelo controle da repressão catabólica (MACGREGOR *et al.*, 1996). As proteínas da família PRTase não apresentam as estruturas primárias e secundárias conservadas, o que é uma característica dessa família. Apesar disso, as estruturas terciárias e quaternárias são bem conservadas, principalmente o motivo de ligação ao PRPP e o *loop* catalítico (GRUBMEYER *et al.*, 1993). A enzima OPRTase de *S. typhimurium* e *E. coli* apresentam 97% de similaridade (HENRIKSEN *et al.*, 1996). A OPRTase de *A. brasilense* apresenta 36% de similaridade com a de *E. coli*.

As enzimas OPRTases podem ser divididas em tipo I e tipo II (MUSICK, 1981). As enzimas do tipo I, são as que fazem parte das vias de purinas e pirimidinas e que apresentam o motivo de ligação ao PRPP, que estruturalmente se apresenta como uma hélice formando um *loop* (HENRIKSEN *et al.*, 1996). Os resíduos de lisina presentes no *loop* têm relação direta com a atividade dessa enzima. Porém este *loop* adota uma estrutura aberta e desordenada em raio-X quando na presença dos substrato (SCAPIN *et al.*, 1995; SCAPIN *et al.*, 1993).

PyrE de *E. coli* e *S. typhimurium* apresentam 213 aminoácidos, e de *S. cerevisiae* apresenta 225 resíduos. Todas PyrE são compostas por dez folhas β e sete α hélices (HENRIKSEN *et al.*, 1996; SCAPIN *et al.*, 1995; GONZÁLEZ-SEGURA *et al.*, 2007). Em *Streptococcus mutans* são 209 resíduos de aminoácidos, formando oito folhas β e sete α hélices (LIU *et al.*, 2010). A folha $\beta 7$ é definida estruturalmente como um *loop*. A proteína pode ser dividida em três partes principais, região C-terminal, Core e região N-terminal (SCAPIN *et al.*, 1995; HENRIKSEN *et al.*, 1996; GONZALES-SEGURA *et al.*, 2007). Estudos demonstram que a OPRtase de *E. coli*, *S. typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis* e *S. cerevisiae* são ativas como homodímeros em solução (POULSEN *et al.*, 1984; BHATIA *et al.*, 1990; DONINI *et al.*, 2017; GONZALEZ-SEGURA *et al.*, 2007).

A interface entre os monômeros é composta por 25 aminoácidos de cada, e o *loop* apesar de não interagir com esses aminoácidos, forma uma ponte entre os dois monômeros. A conformação do *loop* é assimétrica, em um monômero ele está na conformação “fechada”, menos flexível, enquanto no outro está na conformação “aberta” (HENRIKSEN *et al.*, 1996).

O sítio ativo da enzima é formado por estruturas presentes na região C terminal (folhas $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$ e $\beta 7$) de um monômero e região “core” do segundo monômero. Uma molécula de PRPP e uma molécula de ácido orótico (AO) se ligam por monômero (Figura 7). PRPP deve estar ligado ao Mg^{+2} obrigatoriamente (GONZALES-SEGURA *et al.*, 2007). O domínio de ligação ao PRPP se estende da posição 120 a 132 que cobre parte da folha $\beta 6$ até o final do *loop* em *S. typhimurium* (GRUBMEYER *et al.*, 2012), de 133-138 em *S. cerevisiae* (GONZALES-SEGURA *et al.*, 2007) e de 120-128 em *M. tuberculosis* (DONINI *et al.*, 2017), cobrindo exatamente a mesma região. A ligação do AO ocorre no centro do *loop*, onde é coordenado com o anel de um resíduo de fenilalanina (GONZALES-SEGURA *et al.*, 2007; GRUMBMEYER *et al.*, 2012).

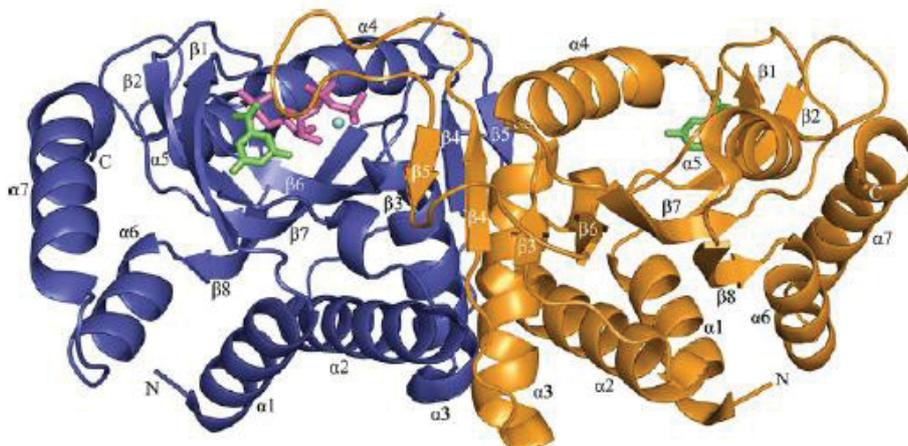


Figura 7. Estrutura tridimensional da proteína OMP sintase de *Salmonella typhimurium*. OPRTase complexada com seus substratos, orotato (em verde), PRPP (em rosa) e Mg^{+2} (em azul). Subunidade A em azul e subunidade B em laranja. Fonte: GRUBMEYER *et al.*, 2012.

A enzima PyrE é extremamente estudada em organismos patogênicos como *S. typhimurium* (GRUBMEYER *et al.*, 2012) e *S. mutans* (LIU *et al.*, 2010), ou com o foco para desenvolvimento de novas drogas para doenças como malária (KRUNGKRAI *et al.*, 2004), toxoplasmose (JAVAID *et al.*, 1999) e tuberculose (DONINI *et al.*, 2017).

A regulação da OPRTase ocorre principalmente a níveis transcricional, como descrito anteriormente para o operon de *E. coli* sensível a UTP, e de forma alostérica, sendo ativada pela presença de ATP e PRPP e inibida pela presença do produto da via, UMP (JONES, 1980).

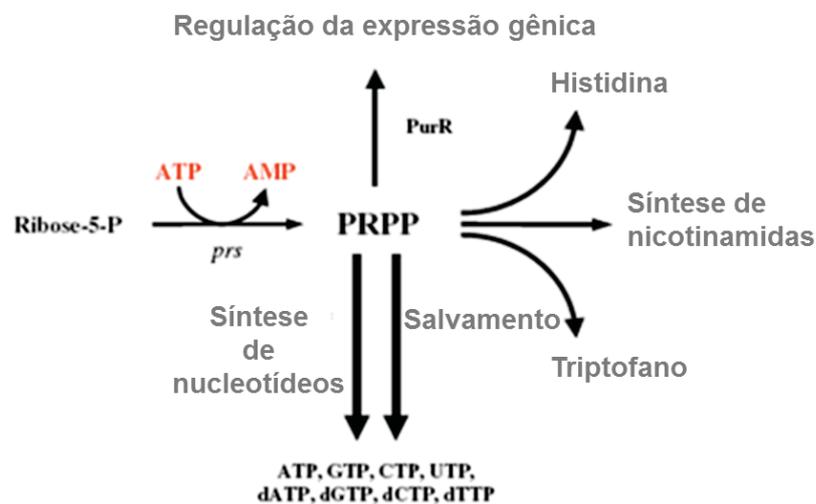


Figura 8. Importância do metabolito 5' fosforibosil- α -1-pirofosfato (PRPP). A síntese do PRPP está representada pela primeira fecha a esquerda, mostrando sua formação a partir de Ribose 5- fosfato, na via das pentoses fosfato, pela enzima PRS, PRPP sintetase, com gasto de um ATP. O PRPP é utilizado em biosíntese e salvamento de pirimidinas e purinas, biosíntese dos aminoácidos histidina e triptofano e produção de nicotinamidas, usadas como grupos prostéticos em uma variedade de diferentes enzimas. Além disso, o PRPP também regula PurR, uma proteína em bactérias gram positivas que regula a síntese dos genes relacionados as vias de purinas. Fonte: adaptado de Kilstrup *et al.*, 2005.

O PRPP é um intermediário comum das vias de pirimidinas e purinas, também é utilizado para a produção de nicotinamidas como NAD^+ e $NADP^+$ e síntese dos aminoácidos histidina e triptofano como mostrado na figura 8 (KILSTRUP *et al.*, 2005). Em bactérias gram positivas como *B. subtilis* e *L. lactis* o PRPP é o principal inativador de PyrR, reprimindo a expressão dos genes presentes no operon *pyr* e é ativador de PurR, que é um repressor da transcrição dos genes *pur*, relacionados a síntese de purinas (EBBOLE; ZALKIN, 1989).

2.7. A proteína Ribonuclease PH

Ribonucleases são essenciais para o metabolismo de RNA onde estão envolvidas no processamento de RNA maduro, na conversão de RNA policistrônico em monocistrônico, na degradação de mRNA, remoção de RNA defeituoso e na digestão de RNA em condições de estresse, como demonstrado na figura 9 (DEUTSCHER, 2006).

Em *E. coli* são 15 Rnases e em *Bacillus subtilis* são 10 (CONDON, 2003; DEUTSCHER, 2003). As ribonucleases podem ser classificadas em endorribonuclease e exorribonucleases. Em *E. coli* são oito exorribonucleases: RNase II, R, D, T, PH, BN, PNPase e ORNase (LI; DEUTSCHER, 2004).

Em relação à regulação das ribonucleases pouco se sabe. Os RNA's são mantidos durante a fase de crescimento exponencial e um gatilho aciona a degradação em outros momentos, mas não se sabe o que é esse gatilho e o que o dispara (DEUTSCHER, 2003). Deutscher (2015a) sugeriu que a regulação das ribonucleases na verdade poderia ocorrer pela prevenção da degradação dos RNA's, por diferentes estratégias como associação do RNA a proteínas, acoplado a transcrição/tradução, localização celular como os degradossomos na membrana, alta especificidade dos sítios de ligação das ribonucleases, estrutura compacta de algumas ribonucleases, entre outros.

Em contrapartida, estudos recentes tem demonstrado um outro tipo de regulação para a ribonuclease R. Rnase R é degradada em condições de crescimento celular, condição em que é acetilada, mas se torna estável em condições de estresse, quando não ocorre sua acetilação. Também tem sua estabilidade afetada pela ligação ao ribossomo. Quando Rnase R está ligada ao ribossomo, o sequestro da enzima leva a proteção do RNA (DEUTSCHER, 2015a).

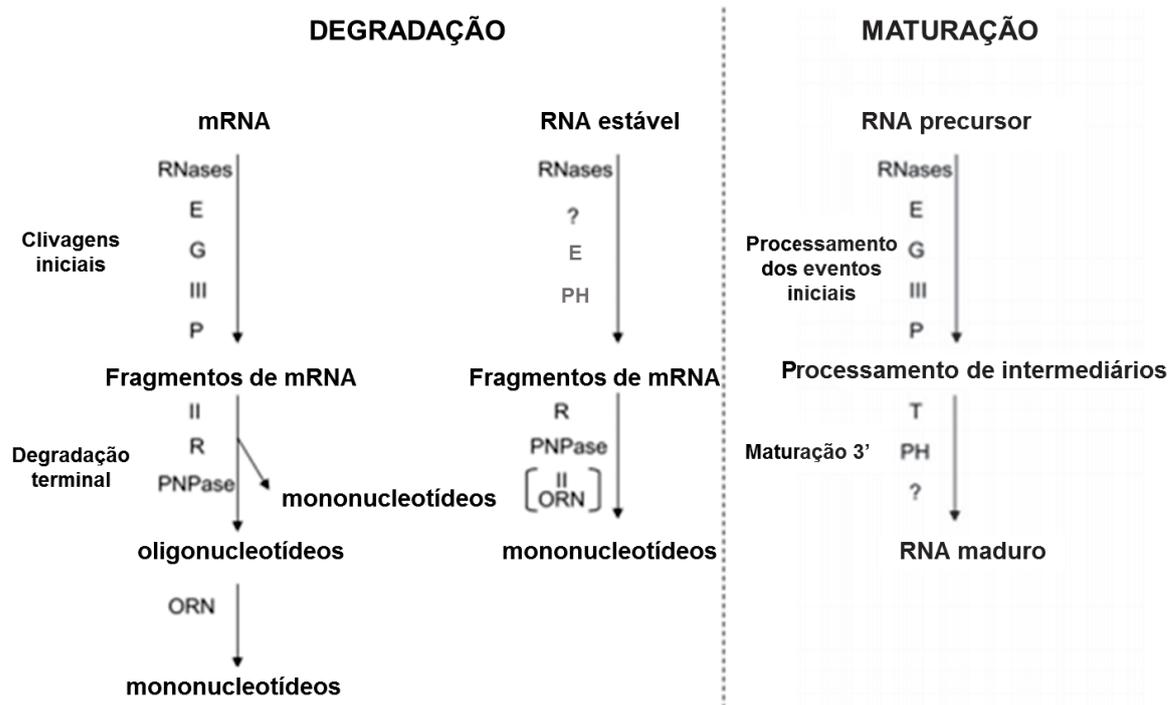


Figura 9. Comparação entre degradação e maturação do mRNA e RNA estável em *Escherichia coli*. A degradação inicial de mRNA e a maturação de rRNA e tRNA é realizada por endorribonucleases, RNase E, G, III e P. As enzimas responsáveis por gerar fragmentos de RNA estável são RNases E e PH, duas exorribonucleases (SULTHANA *et al.*, 2016). Assim como as exorribonucleases, II, R e PNPase são responsáveis pela degradação terminal do mRNA. A degradação de RNA estável também utiliza em sua fase terminal as exorribonucleases R e PNPase. A maturação da porção 3' dos tRNAs e alguns rRNAs, usa as ribonucleases T ou PH. Fonte: adaptado de Deutcher *et al.*, 2006.

A Ribonuclease PH (Rph) foi descrita pela primeira vez por Deutscher *et al.*, (1988). Rph é um membro da família PDX, assim como PNPase, o que significa que é uma exorribonuclease 3'-5' fosfato dependente (ZUO; DEUTSCHER, 2002). Os membros dessa família usam o fosfato em vez da água como nucleófilo gerando nucleosídeos difosfatados (LI, DEUTSCHER, 2004). Em *E. coli* Rph apresenta 238 aminoácidos e massa molecular 25,5 kDa. Entretanto, em géis de eletroforese SDS-PAGE apresenta migração anômala, e aparece perto de 30 kDa, podendo aparecer em múltiplas bandas e/ou formar agregados que podem apresentar massa de até 200 kDa (JARRIGE *et al.*, 2002; KATAYANAGI *et al.*, 1992; OGAWA; OKAZAKI, 1984).

A estrutura de PNPase e Rph é muito similar. Ambas formam uma estrutura de anel hexamérico (Fig 10A), formado de trímeros de dímeros. A estrutura geral de Rph em *Aquifex aeolicus* é formada por dobras do tipo $\beta\alpha\beta$ (Fig. 10B). A formação dos dímeros ocorre em três partes da molécula, região N terminal hélice α_6 , a N-terminal hélice α_4 , próxima ao centro do anel, e no meio das duas α hélices, uma folha β , β_9 . Os sítios de ligação ao fosfato, três, são na

superfície de uma fenda formada pelas α hélices, $\alpha 3$ - $\alpha 5$, e as folhas β , $\beta 6$ - $\beta 9$ (Fig. 10C) (ISHII *et al.*, 2003).

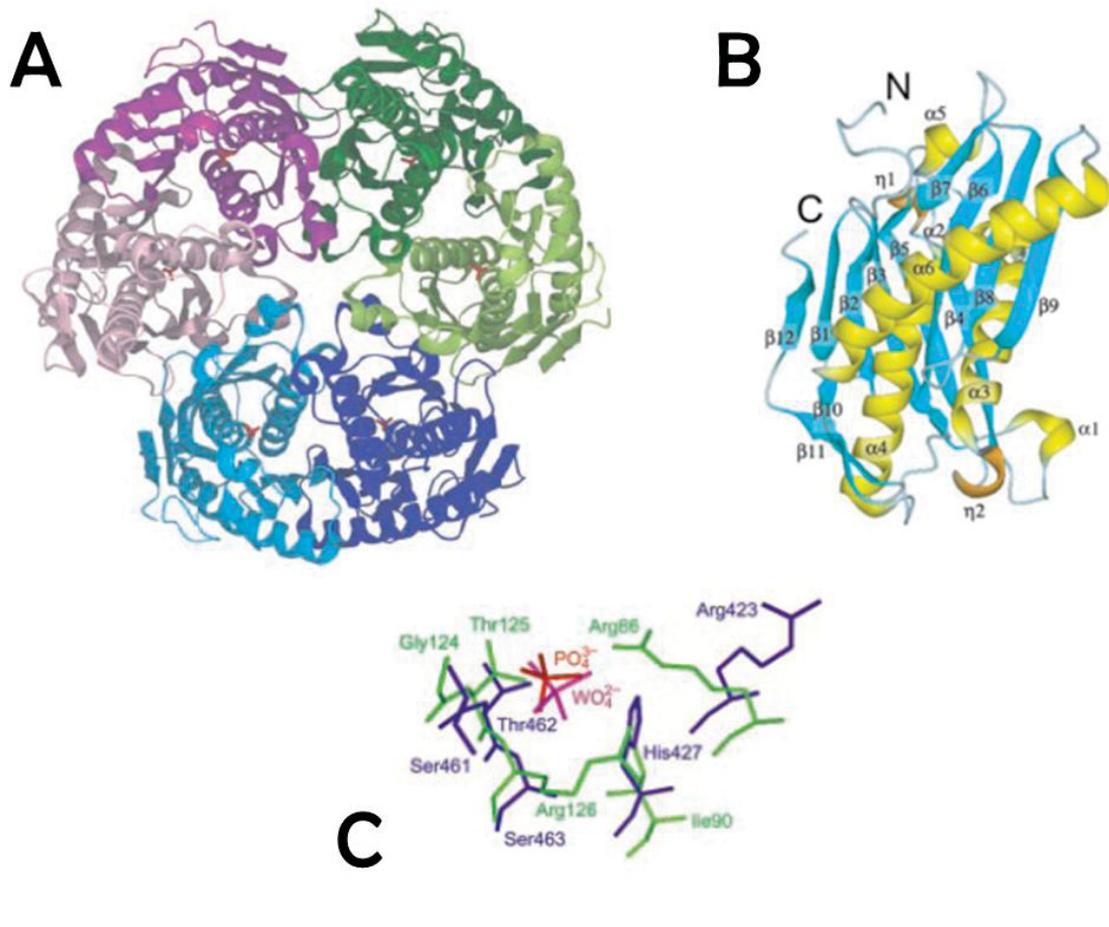


Figura 10. Estrutura da Ribonuclease PH de *Aquifex aeolicus*. (A) Vista do topo, estrutura hexamerica da Ribonuclease PH, as seis subunidades estão em cores diferentes. (B) Subunidade da Ribonuclease PH, C e N, indicam as porções C-terminal e N-terminal, em amarelo e laranja as α hélices, e em azul as folhas β . (C) Vista do sítio de ligação ao fosfato mostrado em vermelho no centro e ao lado dele o tungstato, em rosa. Em verde a estrutura de RNase PH, e em azul a estrutura de PNPase de *Streptomyces antibioticus*. Fonte: adaptado ISHII *et al.*, 2003.

Em *E. coli* Rph está envolvida na maturação do rRNA 17S, precursor do 16S, (SULTHANA; DEUTSCHER, 2013) assim como na maturação de alguns tRNAs (DEUTSCHER, 2015b). Estudos demonstraram por ensaios de *pull-down* que Rph interage com um domínio ácido de 80 aminoácidos na Ribonuclease E, sugerindo uma atividade conjunta das duas ribonucleases na maturação de RNA transportadores (DURÁN-FIGUEROA *et al.*, 2006; MARTÍNEZ *et al.*, 2014).

Sulthana e colaboradores (2016) demonstraram a importância de Rph na iniciação da degradação de RNA ribossomal. Um trabalho recente demonstrou que Rnase II regula a atividade de Rph durante limitação de nutrientes (SULTHANA *et al.*, 2017). A Rnase II é

extremamente importante para a célula, sua ausência causa uma enorme degradação de RNA, levando a morte celular (CHENG, DEUTSCHER, 2003). Entretanto, a morte celular causada na ausência de Rnase II pode ser revertida quando na ausência também de Rph. Na ausência de ambas a célula permanece viável (SULTHANA *et al*, 2016, SULTHANA *et al*, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

As PII são proteínas sinalizadoras do metabolismo de nitrogênio respondendo aos níveis intracelulares de nitrogênio fixado, ao estado energético celular pela ligação de ATP/ADP e a disponibilidade de C/N através da ligação do 2-oxoglutarato (2-OG) (HUERGO *et al.*, 2015). PII agem recebendo esses sinais intracelulares e respondendo a eles por mudanças conformacionais na região do *loop* ou alça T, direcionado assim a interação de PII com suas proteínas alvo (TRUAN *et al.*, 2010). Estudos recentes têm demonstrado que a regulação por PII não é exclusiva do metabolismo de nitrogênio. A descoberta da regulação da Acetil-CoA carboxilase (ACC) por PII em *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense* e *Synechococcus elongatus* abriu um leque de possibilidades até então desconhecido (BOURRELIER *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2014; GERHARDT *et al.*, 2012; HAUF *et al.*, 2016). Entretanto, até o momento, ACC é o único alvo de PII descrito no metabolismo de carbono. A busca por novos alvos de PII foi iniciada por Gerhardt (2015) que utilizou a proteína PII, GlnZ de *A. brasilense* com cauda de histidina imobilizadas em colunas de níquel e um extrato de *A. brasilense* 2812. Esse ensaio gerou uma lista de possíveis proteínas candidatas a interação com GlnZ, reforçando a hipótese de uma regulação mais ampla do metabolismo, por meio de PII, tornando necessário o estudo dessas possíveis interações de forma aprofundada, afim de entender o papel de PII no metabolismo. Entre os possíveis alvos, a proteína Orotato fosforibosiltransferase (PyrE) se destacou por apresentar o maior enriquecimento em relação ao controle nos ensaios de Gerhardt (2015). PyrE é uma enzima da via de síntese “De novo” de pirimidinas, e tem sido extensivamente estudada em microrganismos patogênicos, como um alvo para novas drogas, devido as divergências estruturais entre as de bactérias e de mamíferos (WANG *e al.*, 2012; BREDA *et al.*, 2012; DONINI *et al.*, 2017). Ribonuclease PH é uma exorribonuclease cuja função e regulação não é completamente entendida até o momento, entretanto sabe-se da importância dessa proteína na maturação de RNA e na sua degradação em períodos de limitação de nutrientes (DEUTSCHER, 2003; SULTHANA *et al.*, 2016; SULTHANA *et al.*, 2017). O gene *pyrE* está no mesmo operon que o gene *rph* (ANDERSEN *et al.*, 1992), sugerindo uma possível ligação entre essas duas proteínas. Neste trabalho foi avaliado a capacidade das proteínas PyrE e Rph de interagir com as proteínas PII de *A. brasilense*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Investigar a possível interação de proteínas PII, GlnZ e GlnB, com as proteínas Orotato fosforibosiltransferase e Ribonuclease PH de *Azospirillum brasilense*.

4.2. Objetivos Específicos

- ✓ Clonar os genes *pyrE* e *rph* em vetores de expressão pET28a e pET29a;
- ✓ Expressar e purificar as proteínas PyrE e Rph, nas suas formas nativas e com cauda de histidina;
- ✓ Investigar a interação de PyrE com as proteínas PII, GlnZ e GlnB *in vitro*, na presença de seus efetores, ATP, ADP e 2-Oxoglutarato;
- ✓ Investigar a interação de PyrE com a proteína mutante GlnZ- Δ loop.
- ✓ Investigar a interação de PyrE com a proteína GlnZ uridililada.
- ✓ Investigar a interação da proteína Ribonuclease PH com GlnZ.

5. METODOLOGIA

5.1. Bactérias e Plasmídeos

As bactérias e plasmídeos que foram usados neste trabalho estão listados nas TABELA 1 e TABELA 2.

TABELA 1. ESTIRPES BACTERIANAS.

Estirpes	Características	Referência
<i>E. coli</i>		
BL21 (λDE3)	hsdS, gal(λ clts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
DH10B	Sm ^r , F ['] [<i>proAB</i> ⁺ lacZ Δ M15]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>A. brasilense</i>		
FP2	Nal ^r Sm ^r Estirpe selvagem, SP7 Nif ⁺	Pedrosa e Yates, 1984

Fonte: a autora.

TABELA 2. PLASMÍDEOS.

Plasmídeos	Características	Referência
pET28a	Km ^r vetor de expressão promotor T7	Novagen
pET29a	Km ^r vetor de expressão promotor T7	Novagen
pAGRPHhis	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> Rph 6xHis-Tag-N-terminal no pET28a.	Este trabalho
pAGRPH	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> Rph nativa no pET29a.	Este trabalho
pAGPYREhis	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> PyrE 6xHis-Tag-N-terminal no pET28a.	Este trabalho
pAGPYRE	Km ^r , Expressa <i>A. brasilense</i> PyrE nativa no pET29a.	Este trabalho
pLHDK7PZHis	Cm ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> His-GlnZ em pDK7	Huergo <i>et al.</i> , (2006)
pLMA-MLV1	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> His-GlnB em pET28a.	Araújo <i>et al.</i> , (2004)
pMSA4	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> GlnZ nativa em pET29a.	Moure <i>et al.</i> , (2012)
pLH25PET	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> GlnB nativa em pET29a.	Huergo <i>et al.</i> , (2005)
pGAHisGlnZΔloop	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> His-GlnZ- Δ loop em pET28a.	Araujo (2018)

Fonte: a autora.

5.2. Condições de cultivo

Para cultivo de *E. coli* as células foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) mantidas a temperatura de 37°C sob agitação constante. Para cultivo em meio sólido foi utilizado o meio Luria- Bertani com ágar (LA) sendo as placas mantidas a 37°C.

Composição do meio Luria Bertani: (SAMBROOK *et al.*, 1989)

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

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato

Composição do meio NFb lactato (SAMBROOK *et al.*, 1989):

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

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl 20 mM. As soluções de fosfato (K₂HPO₄ 17,8 g/L e KH₂PO₄ 159,5 g/L) e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas no momento do uso.

5.3. Antibióticos

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

5.4. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram construídos com base no genoma de *Azospirillum brasilense* sp245 (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011), sendo identificado os códons de início (identificados na Tabela 3 em verde) e códons complementares de termino (identificados na tabela 3 em azul). Foram adicionados os sítios de corte para as enzimas *Nde*I(F) e *Bam*HI(R) respectivamente, como mostrado na Tabela 3, em cor vermelha. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT e estão representados na TABELA 3.

TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS PARA ESTE TRABALHO E RESPECTIVAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

Nome do Primer	Sequência	Enzima de restrição
PyrE F	5'- GTTAGCATATGACCACCGCCGCTTTGC – 3'	<i>Nde</i> I
PyrE R	5'- CTCCGGGATCCTCAGTCGAAGCTGGCCTTGC– 3'	<i>Bam</i> HI
rPH F	5'- CATGCCATATGCGTCCCTCCGGC– 3'	<i>Nde</i> I
rPH R	5'- CGCCTGGATCCTTACTCACCGCGATCGC– 3'	<i>Bam</i> HI

Fonte: a autora.

*Em vermelho estão destacados os sítios de corte para as enzimas *Nde*I e *Bam*HI.

*Em verde estão destacados os sítios de início da tradução.

*Em azul estão destacados os sítios de termino da tradução.

5.5. Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al.*, (1989). O DNA foi visualizado após tratamento com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em transiluminador de luz ultravioleta e o perfil eletroforético foi registrado fotograficamente por um sistema de imagem-acoplado (UVP).

5.6. Amplificação de DNA por PCR

A amplificação de DNA foi realizada utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER; WILSON, 1991). Colônias isoladas de *Azospirillum brasilense* FP2 foram aquecidas a 100°C durante 10 minutos, e foram usadas como DNA molde nas reações. Os tampões de reação continham: 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 5% (v/v) da cultura aquecida como DNA molde, 5% (v/v) DMSO e *Pfu turbo* polimerase com atividade revisora (purificada em nosso laboratório).

5.7. Ensaio de restrição e ligação

As condições da reação para o ensaio de restrição foram realizadas conforme recomendações do fabricante das endonucleases usadas neste projeto (*Bam*HI e *Nde*I da empresa Thermo Scientific). Os vetores pET28a e pET29a, assim como os DNAs amplificados anteriormente (insertos), foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I. Para reação de ligação, o DNA plasmidial foi digerido, e os insertos foram misturados ao tampão de ligação contendo a T4 DNA ligase e incubados a 4°C durante a noite.

5.8. Transformação bacteriana por Choque Térmico

5.8.1. Preparo de Células

As células termocompetentes foram preparadas segundo Chung *et al.*, (1989). Colônias de *E. coli* DH10B ou BL21 (λ DE3) foram coletadas de uma placa de meio LA e incubadas com meio LB a 37°C sob agitação constante *overnight*. Posteriormente a cultura foi transferida para 250 ml de meio LB + antibiótico específico, mantido a 37°C sob agitação constante até a DO₆₀₀ 0,3 e 0,4. As células foram mantidas em gelo durante 30 minutos, centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em uma solução gelada de CaCl₂ 0,1M. Após 60 minutos no gelo as células foram novamente centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas

em 8 ml de solução gelada de CaCl_2 0,1M + glicerol 15%. Foram preparadas alíquotas de cerca de 200 μL e armazenadas a -80°C .

5.8.2. Transformação

Para a transformação, as células competentes foram mantidas em gelo, aproximadamente 10 minutos antes do procedimento. O DNA plasmidial de interesse foi adicionado à solução de células, que foi mantida em gelo por 30 minutos, seguido de aquecimento a 42°C por 2 minutos e banho de gelo por 2 minutos. As células transformadas foram então ressuspensas em 1 ml de meio LB, recuperadas a 37°C por 40 minutos, e em seguida plaquedas em meio LA com antibiótico adequado e incubadas em estufa a 37°C durante a noite.

5.9. Purificação de plasmídeo

A extração de plasmídeos foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Aproximadamente 3 ml de uma cultura de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse crescidas *overnight* a 37°C , foi centrifugada a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorf), por 60 segundos. O precipitado foi então ressuspense em tampão GET (50mM de glucose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA), com adição de 0,3% (v/v) RNase (2 mg/ml). A lise celular foi realizada com 1% de SDS e 0,2 M de NaOH. As proteínas e o DNA cromossomal foram precipitados com uma solução de Kacf (acetato de potássio 3 M, pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 M) durante 10 minutos em banho de gelo. Então foi adicionado 200 μL de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado em vortex e centrifugado a 13.000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo onde foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol, e mantido em gelo durante 5 minutos. A amostra foi centrifugada novamente a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorff), durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μL etanol 70% e centrifugado novamente a 13.000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado a amostra foi seca em estufa, a 37°C , durante uma hora. Em seguida foi ressuspense em água e congelado em freezer a -20°C .

5.10. Análise de plasmídeos recombinantes

Para a análise dos plasmídeos recombinantes duas técnicas foram utilizadas. Inicialmente foi utilizada a técnica de PCR de colônia, retirando a colônia da placa e utilizando como DNA molde para PCR juntamente com os primers apresentados na tabela 3 para *pyrE* e *rph*. A segunda estratégia utilizada foi a purificação do plasmídeo, seguido da restrição do plasmídeo, como descrito nos itens 5.9 e 5.7, respectivamente.

5.11. Subclonagem dos genes *pyrE* e *rph*

Primeiramente os genes alvos foram clonados em pET28a, e após a confirmação do clone por análise de restrição e sequenciamento, os genes foram subclonados em pET29a. Os clones em pET28a foram cortados com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* liberando o inserto. Essa amostra foi então submetida a corrida em gel de agarose 1%, e a banda referente ao gene, que foi liberado do plasmídeo, foi cortada do gel e transferida para um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente esse fragmento foi extraído do gel utilizando o Kit *Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit* GE Healthcare. O fragmento de DNA extraído foi incubado com o plasmídeo pET29a, previamente purificado e digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, e a ligação ocorreu como descrito no item 5.7. O plasmídeo recombinante foi transferido para uma estirpe de *E. coli* DH10B por meio de transformação quimiocompetente.

5.12. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o método de terminação de cadeia por dideoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977) e um sequenciador automático de DNA (*Applied Biosystems*). Os plasmídeos utilizados como molde para o sequenciamento foram purificados segundo o item 5.9 e posteriormente submetidos a PCR com os *primers* específicos para o gene de interesse ou para o plasmídeo pET, o T7 terminador e iniciador.

Os produtos de PCR foram precipitados para a reação de sequenciamento adicionando acetato de amônio 7,5M e etanol PA (para 10 μ L de reação foi utilizado 2 μ L de acetato de amônio e 66 μ L de etanol). A mistura foi então centrifugada durante 45 minutos a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μ L de etanol 70%,

centrifugado durante 15 minutos a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorf), e posteriormente seco em bancada. As análises foram realizadas no programa BioEdit.

5.13. Expressão das proteínas de interesse

A expressão das proteínas de interesse foi realizada em células de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos pAGRPHhis, pAGRPH, pAGPYREhis ou pAGPYRE, que expressam, respectivamente, as proteínas Rph-His, Rph nativa, PyrE-His e PyrE nativa. As células foram cultivadas em 200 ml de meio LB com antibiótico, a 37°C até atingirem a DO₆₀₀ 0,5-0,7 a indução da expressão das proteínas foi iniciada com a adição de 0,5 mM de isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG) à cultura que foi incubada a 37°C durante 3 horas sob agitação constante. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em tampão A para proteínas nativas (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), e para as com cauda de histidina (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, 25 mM de Imidazol, pH 8,0). As células foram mantidas em banho de gelo durante o procedimento de sonicação para lise celular. Após a lise, o extrato foi centrifugado por 30 minutos, 20000 x g a 4 °C e a fração solúvel foi carregada na coluna cromatográfica adequada para purificação.

5.14. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteína foi realizada como descrito por Laemmli (1970), sob condições desnaturantes. A concentração do gel variou entre 7,5 a 12,5% de acordo com a massa molecular da proteína. As soluções utilizadas foram preparadas segundo Huergo e colaboradores (2006). As corridas foram realizadas sob voltagem de 100 a 200 V em tampão de corrida Tris Glicina. Após a corrida o gel foi corado com Azul de Coomassie.

5.15. Purificação das proteína PyrE-His e Rph-His de *Azospirillum brasilense*

Para a purificação das proteínas PyrE e Rph fusionadas com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal, foi utilizada cromatografia de afinidade em coluna Hitrap-

Chelanting (GE HealthCare) acoplada a uma bomba peristáltica. A coluna Hitrap- Chelanting foi carregada com NiCl_2 , como descrito pelo fabricante, e lavada com água ultrapura para retirar o excesso de cloreto de níquel. Posteriormente a coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão A (TrisHCl 50mM, NaCl 100mM, Imidazol 25mM, pH 8,0) carregada com a fração solúvel das proteínas de interesse (preparada como descrito no item 5.13). As proteínas não ligadas foram coletadas e a fração foi denominada como Fração não Ligada (FNL). Em seguida a coluna foi lavada com o tampão A, cerca de 2 volumes de coluna, e coletada a fração denominada Fração de Lavagem (FL). A eluição da proteína ocorreu por meio de gradiente de imidazol que variou de 100 mM a 1 M, sendo coletadas frações de aproximadamente 1,5 ml. As frações foram analisadas por gel de SDS-PAGE. As frações com maior concentração de proteína foram agrupadas e submetidas a diálise em membranas de *Cut-off* de 12kDa em tampão de diálise (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, Imidazol 25mM, Glicerol 50%). Durante a diálise, parte da proteína PyrE precipitou, sendo então centrifugada a 20.000 x g, por 10 minutos e recuperada. Ambas as proteínas foram alíquotadas e armazenadas a -20°C .

5.16. Teste de Resina para proteínas nativas

Para a purificação das proteínas nativas, PyrE e Rph foi realizado um teste de ligação a resina, com resinas Sepharose Fast Flow (GE HealthCare) sendo elas, SP, DEAE, Heparina, CM e Q.

Para realização do teste, 1 ml das resinas supracitadas foram alíquotadas em microtubos, e deixadas decantar durante alguns minutos até que fosse possível retirar a camada líquida referente ao etanol 20% onde estão armazenadas as resinas. Posteriormente foi realizada duas lavagens com 500 μL água ultrapura. Foi então adicionado as resinas 500 μL do tampão TP1 (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8,0) e 500 μL da Fração Solúvel (FS) de Rph ou PyrE (como descrito no item 5.13), e então foi homogeneizado por vortéx e mantido a temperatura ambiente durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e separado, denominado como Fração não ligada (FNL). Foram realizadas duas lavagens com tampão TP1, denominadas A1 e A2. Posteriormente foi utilizado o tampão TP2 (Tris-HCl 50mM, NaCl 1M, pH 8,0) para eluir a proteína (fração B). As amostras foram analisadas por gel de eletroforese SDS-PAGE. Para a purificação foi selecionada a resina na qual a proteína se ligou com maior afinidade e foi eluída quando na presença do TP2.

5.17. Purificação da proteína Rph nativa de *Azospirillum brasilense*

Para Rph nativa de *A. brasilense* a resina escolhida foi a de heparina. Foi utilizada uma coluna Hitrap- Heparina, que foi lavada com 5 volumes de água, e posteriormente equilibrada com o tampão TP1. A fração solúvel de Rph (descrito no item 5.13) foi carregada na coluna, e coletada a fração denominada Fração não ligada (FNL). Foi realizada a lavagem da coluna com o tampão TP1 e coletada a fração denominada Fração de Lavagem (FL). Em seguida foi utilizado um gradiente de NaCl que variou de 100mM a 1M para a eluição da proteína, com frações de 1 ml coletadas. As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e as frações que apresentaram maior concentração de proteínas foram agrupadas. Optou-se por realizar a retirada do sal do tampão por meio de colunas Desalting. As colunas Desalting (GE HealthCare) foram lavadas com água ultrapura e posteriormente equilibradas com tampão de Desalting (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM e 10% de Glicerol), as frações agrupadas na etapa anterior foram carregadas na coluna e eluídas no tampão de desalting. As frações eluídas que apresentaram proteína foram agrupadas, aliqüotados, quantificadas e armazenadas a -20°C.

5.18. Purificação da proteína PyrE nativa de *Azospirillum brasilense*

A proteína PyrE nativa de *A. brasilense* foi purificada da mesma forma que a proteína Rph descrita no item 5.17. As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e as frações que apresentaram maior concentração de proteínas foram agrupadas e submetidas a gel filtração em Sephacryl S-200 (GE HealthCare) acoplada ao sistema AKTA. O tampão utilizado para a corrida foi Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, Glicerol 5%, pH 8,0, foram coletadas frações de 1 ml, analisadas por meio de eletroforese SDS-PAGE. As frações que apresentaram maior quantidade de proteínas sem contaminantes foram agrupadas, aliqüotadas e armazenadas a -20°C.

5.19. Cromatografia em Gel filtração em Superose 6

A cromatografia de gel filtração analítica foi realizada em coluna de Superose 6 10/30 (GE Healthcare) utilizando um tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, glicerol 5% (v/v), pH 8,0. A coluna foi calibrada com o marcador de massa molecular da BioRad com as seguintes

proteínas e massas: Tiroglobulina (670 kDa), Gama-globulina (158 kDa), Ovoalbumina (44 kDa) e Mioglobina (17 kDa). A proteína purificada foi carregada na coluna e a corrida foi realizada a temperatura ambiente com um fluxo de 0,5 ml/min.

5.20. Purificação das proteínas PII

As proteínas GlnZ e GlnB de *Azospirillum brasilense* foram purificadas de acordo com Moure *et al.*, (2012) utilizando um aquecimento prévio a 70°C e posteriormente carregando o extrato solúvel em uma resina de Heparina, e eluída em um gradiente de KCl. As proteínas His-GlnZ e His-GlnB foram purificadas por meio de uma resina Hitrap – Chelanting carregada com NiCl₂ e eluídas em gradiente crescente de imidazol (ARAÚJO *et al.*, 2004; MOURE *et al.*, 2012). His-GlnZ-Δ loop foi purificada de acordo com Araujo (2018).

5.21. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas segundo o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente Bradford (BioRad). As reações foram preparadas em placas de 96 poços utilizando 20μL de volume final de amostra e 180μL do reagente de Bradford. Para curva padrão foi utilizado albumina bovina (BSA) em concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 μg/ml. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (BioRad) a 595 nm.

5.22. Identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS

As proteínas purificadas neste trabalho, PyrE e Rph, foram submetidas a análise por MALDI-TOF/MS segundo Shevchenko *et al.*, (1996) e Gerhardt (2015). As bandas correspondentes as proteínas de interesse foram extraídas de gel SDS-PAGE e armazenadas em microtubos de 1,5 ml. As bandas foram descoradas com descorante (bicarbonato de amônio 25mM, 50% de acetonitrila, pH 8,0), realizando-se diversas lavagens, até que o fragmento de gel perdesse a coloração azulada. Posteriormente os fragmentos foram lavados duas vezes com acetonitrila 100% por cinco minutos e em seguida foram secos em bancada. Para a digestão com a enzima tripsina, as bandas foram incubadas com tampão bicarbonato de amônio 40 mM,

pH 8,0, acetonitrila 10% e tripsina 15ng/ μ L, durante 30 minutos em gelo, e posteriormente durante 16 horas a 37°C. Um microlitro da solução de digestão foi misturada com um microlitro da matriz de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 0,1%, saturada com a matriz HCCA -ácido α -ciano-4-hidroxinamico. As amostras foram então aplicadas em placa de MALDI e incubadas em temperatura ambiente até a cristalização. A placa foi então analisada em espectrômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics) onde geraram os picos adquiridos no modo positivo utilizando voltagem de 20 kV, usando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). A identificação das proteínas foi realizada utilizando o software Mascot 2.2 e o banco de dados de proteínas de *Azospirillum brasilense* sp.245 (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011).

5.23. Ensaio de Co-precipitação (*Pull-Down*) *in vitro*

Para os ensaios utilizando a técnica de co-precipitação de complexos formados na resina MagneHis-Ni²⁺ (Promega) foram utilizadas as proteínas purificadas neste trabalho PyrE-His, Rph-His, PyrE, Rph, His- GlnZ, além das proteínas GlnB, GlnZ, His-GlnB e His-GlnZ- Δ loop (gentilmente cedidas por Gillize Aparecida Telles de Araújo e Alysson Henrique Urbanski). Os ensaios foram realizados segundo Huergo *et al.*, (2007) com modificações. Foi utilizado um tampão de interação, denominado TPI (Tris-HCl 50mM pH 8,0, NaCl 100mM, Glicerol 20%, Imidazol 40 mM, MgCl₂ 5 mM, detergente -LDAO, Tween 20, Nonidet ou Triton-0,05% e 1 mM dos efetores, ATP, ADP e 2-OG) e para cada reação foi utilizado 5 μ L de resina magnética. A resina foi primeiramente lavada com 200 μ L de TPI e então foi adicionado 400 μ L de TPI + 20 μ g de proteína His e incubado por 15 minutos, homogeneizando em vórtex a cada 3 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida o tampão foi retirado a resina foi lavada com 200 μ L de TPI. Foi adicionado 400 μ L + 50 μ g da proteína nativa, e incubado por 15 minutos, homogeneizando em vórtex a cada 3 minutos, a temperatura ambiente. Por fim, o tampão foi retirado e realizado mais três lavagens consecutivas com tampão TPI. Para que ocorresse o desligamento da proteína da resina foi utilizado 20 μ L de tampão de amostra (TrisHCl 0,0625 M, pH6,8, 0,01% de azul de bromofenol, 10% de glicerol, 2% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol) por tubo. As amostras foram fervidas a 100°C durante 5 minutos e aplicadas em gel de SDS-PAGE para análise.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Clonagem dos genes *pyrE* e *rph* de *A. brasilense*

Com o objetivo de caracterizar a interação das proteínas PII com as proteínas PyrE e Rph de *A. brasilense*, os genes *pyrE* (Orotato fosforibosiltransferase) e *rph* (Rnase PH) foram clonados no vetor de expressão pET28a. Para este fim, iniciadores foram desenhados para permitir a amplificação destes genes por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do genoma de *A. brasilense* sp245. A amplificação dos genes por PCR ocorreu de acordo com as condições descritas no item 5.6. Para o gene *pyrE* (695 pb), a temperatura de amplificação com TaqPolimerase foi 69,6°C e para Pfu 69,9°C. Para o gene *rph* (720 pb) a temperatura de amplificação com TaqPolimerase foi 65,5°C e para Pfu 62,8°C.

As reações de PCR para ambos os genes *rph* e *pyrE* geraram um amplicon único com o tamanho esperado como pode ser observado em análise de eletroforese (Figura 11). Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e ligados ao vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. As misturas de ligação foram transformadas em *E. coli* DH10B e plaqueadas em meio LA contendo canamicina.

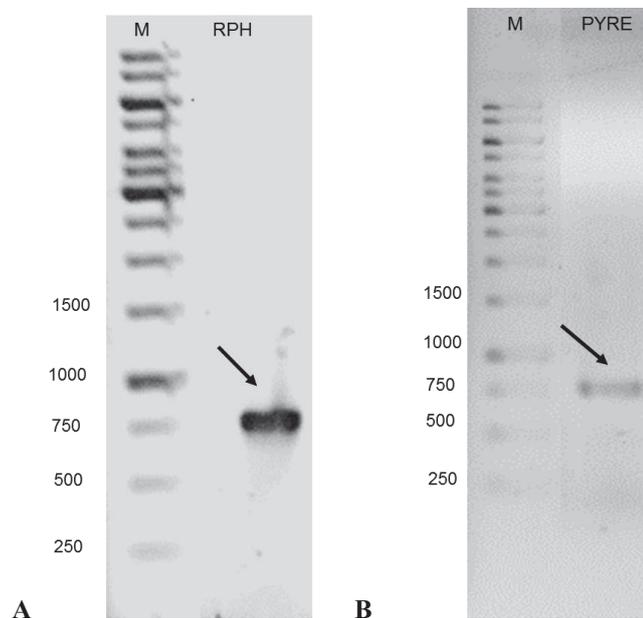


Figura 11. Perfil eletroforético das amplificações do gene *rph* e *pyrE* por reação em cadeia da polimerase (PCR). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e revelado por sistema UVP. **(A)** amplificação do gene *rph*. M, marcador de peso molecular representado em pares de bases (pb), RPH fragmento do gene *rph* amplificado. **(B)** amplificação do gene *pyrE*. M, marcador de peso molecular representado em pares de bases (pb), PYRE, fragmento do gene *pyrE* amplificado.

As colônias que cresceram na placa após 24 horas de incubação foram selecionadas. Foi realizada a purificação dos plasmídeos das colônias selecionadas e restrição com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. As análises dos plasmídeos recombinantes foi realizada através de eletroforese em gel de agarose. Na Figura 12 pode ser observado o aparecimento de duas bandas: uma referente ao vetor (5,5 kb) e outra com o tamanho esperado para os insertos, *rph* (720 pb) e *pyrE* (695 pb). Os plasmídeos recombinantes foram denominados pAGPYREhis e pAGRPHhis para *pyrE* e *rph*, respectivamente.

Uma vez obtidos os clones em pET28a foi realizada a subclonagem dos genes *pyrE* e *rph* em pET29a. A clonagem com *NdeI* em pET28a resulta na adição de uma cauda de seis histidinas na porção N-terminal da proteína a ser expressa, facilitando a purificação das proteínas recombinantes. Porém, ensaios preliminares de interação entre PyrE e RNasePH com cauda de histidina e GlnZ em sua forma nativa se mostraram inconclusivos. Assim, optamos pela subclonagem dos genes no vetor pET29a a fim de obter as sequências nativas das proteínas sem adição de caudas.

Os genes *pyrE* e *rph* clonados no pET28a foram removidos por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, e extraídos do gel após eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos foram purificados por meio de kit e ligados ao vetor pET29a. A mistura de ligação foi transformada em células DH10B de *E. coli*. Colônias resistentes a canamicina foram selecionadas e os plasmídeos recombinantes foram confirmados por meio de restrição com as enzimas *NdeI* e *BamHI*.

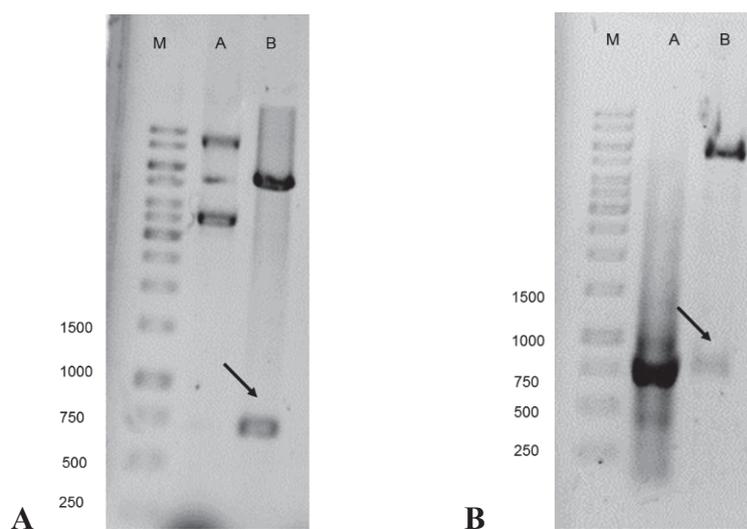


Figura 12. Perfil eletroforético da restrição dos plasmídeos pAGRPHhis e pAGPYREhis. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e relevado por sistema UVP. Por meio de restrição do plasmídeo, purificado a partir de colônias obtidas na transformação, foi realizada a confirmação da inserção do gene por restrição do plasmídeo com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. (A) gene *rph* em plasmídeo pET28a. M, marcador de peso molecular representado em pares de bases (pb) A, plasmídeo pET28a fechado, apresentando três bandas que indicam

diferentes estados de condensação. B, restrição do plasmídeo purificado de colônia. A seta indica uma banda próxima a 720 pb referente ao tamanho esperado do gene, a outra banda é referente ao plasmídeo aberto com aproximadamente 5500 pb, como esperado. **(B)** gene *pyrE* em plasmídeo pET28a. M, marcador de peso molecular representado em pares de bases (pb), A, gene *pyrE* purificado. B, restrição do plasmídeo purificado de colônia. A seta indica uma banda próxima a 695pb referente ao tamanho esperado do gene de *pyrE*.

Após a confirmação dos clones os mesmos foram preparados e enviados para sequenciamento. Foram utilizados os *primers* T7 (iniciador e terminador) que estão flanqueando o sítio de policlonagem do plasmídeo. Foram utilizados também os *primers* desenhados para cada gene. O sequenciamento foi capaz de cobrir toda a extensão do gene. As sequências foram analisadas utilizando o programa BioEdit.

6.2. Purificação das Proteínas

6.2.1. Purificação das proteínas PII

As proteínas PII de *A. brasilense* GlnZ, GlnB, His-GlnB e His-GlnZ- Δ loop foram gentilmente cedida pelos colegas Alysson Henrique Urbanski e Gillize Aparecida Telles de Araújo. A Figura 13 demonstra a purificação de His-GlnZ, que foi purificada em coluna HiTrap Chelating carregada com níquel e equilibrada com tampão A (TrisHCl 50 mM, KCl 100 mM, imidazol 25 mM, pH 8,0). A fração solúvel foi carregada na coluna e a fração não ligada (FNL) foi coletada. Posteriormente foi realizada a lavagem com o tampão A, obtendo-se a fração de lavagem (FL), e a eluição ocorreu em gradiente de imidazol de 100 mM a 1M.

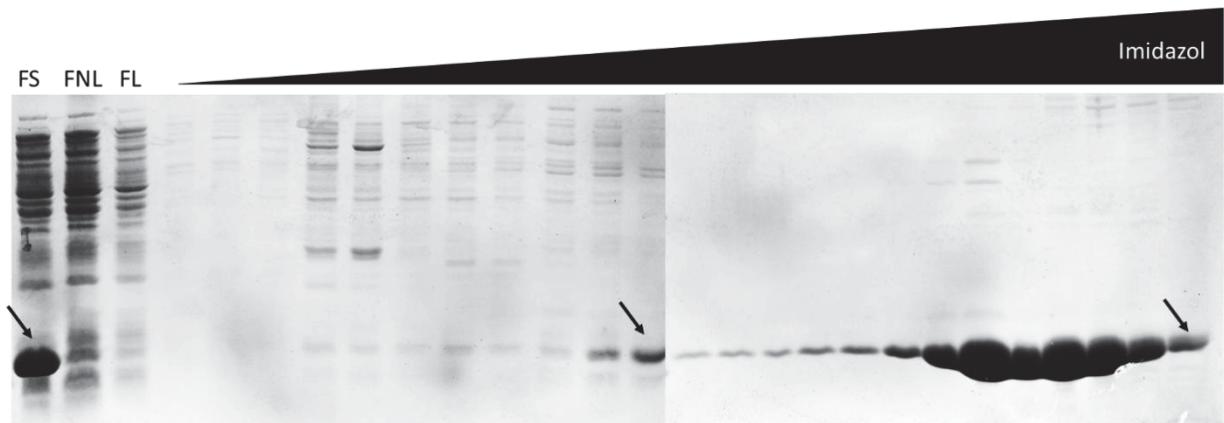


Figura 13. Perfil eletroforetico da purificação da proteína His- GlnZ de *Azospirillum brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomasie R-250. A purificação de His-GlnZ foi realizada em colunas Hitrap- Chelating carregadas com NiCl_2 e equilibradas em tampão. FS, fração solúvel após sonicação, FNL, fração não ligada, obtida durante a passagem da amostra pela resina, FL, fração de lavagem, obtida após a passagem do tampão para retirada de excesso de proteínas. A proteína His-GlnZ foi eluída em gradiente crescente de Imidazol. As setas indicam, da esquerda para a direita, a proteína His-GlnZ obtida a partir do extrato sonicado,

a primeira fração da proteína a ser eluída, e a última fração da proteína a ser eluída. Posteriormente as frações indicadas pela segunda até a fração indicada pela terceira setas, da esquerda para a direita foram agrupadas e coletadas, posteriormente foram submetidas a diálise a temperatura ambiente e armazenadas a -40°C em glicerol 10%.

Após a purificação foram escolhidas as frações mostradas na figura 13 entre as setas, que foram reunidas e submetidas a diálise em membranas de *Cut-off* de 12 kDa em tampão de diálise (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, Imidazol 25mM, Glicerol 10%) a temperatura ambiente por 4 horas. Posteriormente a proteína foi alíquotada e armazenada a -40°C . Foi avaliada a concentração de proteína nas alíquotas por meio da técnica de Bradford, obtendo-se o valor de 1,6 mg/ml.

6.2.2. Expressão e purificação de Rph-His e PyrE-His de *Azospirillum brasilense*

Para a purificação da proteína Rph-His foi utilizado um protocolo padrão de purificação de proteínas com cauda de histidina. Após o extrato de células ser sonificado, este foi centrifugado para obtenção de um fração solúvel que foi carregada em uma coluna HiTrap-Chelating, previamente carregada com NiCl_2 e equilibrada com tampão TP1 (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, Imidazol 25mM, pH 8,0), sendo eluída em um gradiente de imidazol de 100mM a 1 M. Como demonstrado na figura 14, as frações de eluição de Rph foram obtidas logo no início do gradiente de imidazol. Após a purificação e análise por SDS-PAGE as frações que continham maior quantidade de proteína e menor quantidade de contaminantes foram agrupadas e dialisadas em tampão (Tris HCl 50mM, NaCl 100mM, imidazol 25mM e 50% de glicerol) a 4°C . A proteína purificada foi armazenada a -20°C .

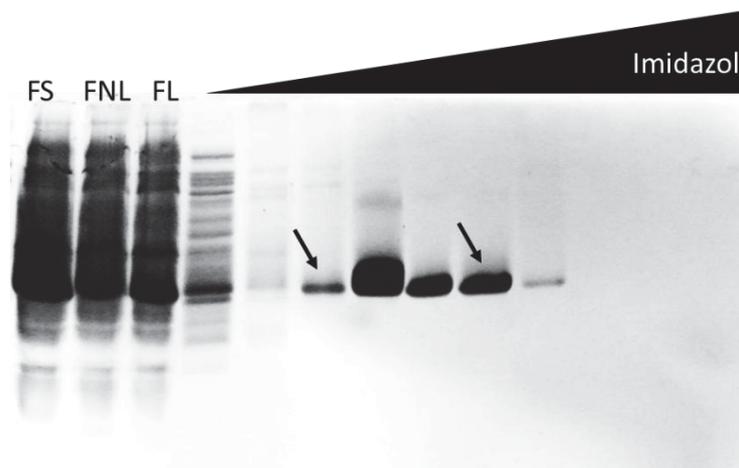


Figura 14. Perfil eletroforético da purificação da proteína Rph-His de *A. brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomassie R-250. A purificação de Rph-His foi realizada em colunas Hitrap-Chelating carregadas com NiCl_2 e equilibradas em tampão. FS, fração solúvel após sonificação,

FNL, fração não ligada, obtida durante a passagem da amostra pela resina, FL, fração de lavagem, obtida após a passagem do tampão para retirada de excesso de proteínas. A proteína Rph-His foi eluída em gradiente crescente de Imidazol. A proteína apresentou um tamanho próximo a 30 kDa. As setas indicam o início da eluição de Rph e o final da eluição, da esquerda para a direita respectivamente. As frações indicadas pelas setas e entre elas foram agrupadas e passaram por diálise a 4°C. Posteriormente foram alíquotadas e armazenadas a -20°C.

A proteína PyrE-His foi purificada da mesma forma descrita para Rph-His como demonstrado na figura 15. No entanto, durante o processo de diálise parte da proteína precipitou. A amostra foi então centrifugada a 20.000 x g, por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi recuperado, alíquotado e armazenado a -20°C. É possível que a precipitação tenha ocorrido pela grande quantidade de proteína obtida no processo.

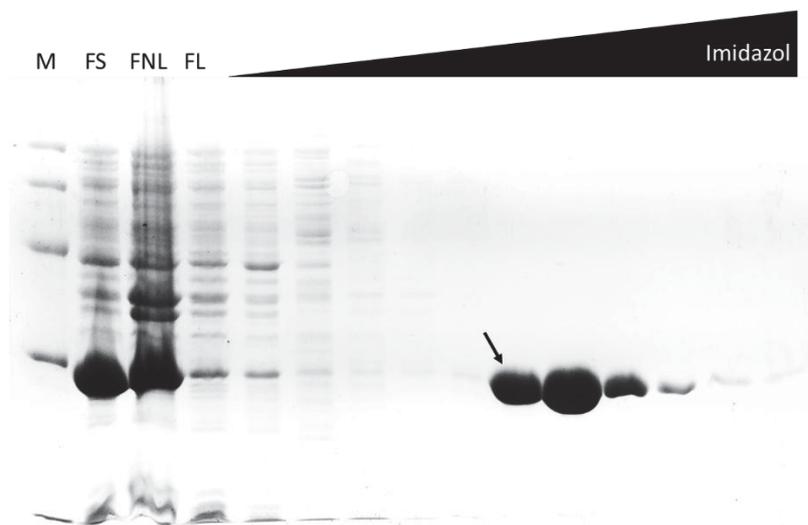


Figura 15. Perfil eletroforético da purificação da proteína PyrE-His de *Azospirillum brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomassie R-250. A purificação de PyrE-His foi realizada em colunas Hitrap- Chelating carregadas com NiCl₂ e equilibradas em tampão. FS, fração solúvel após sonicação, FNL, fração não ligada, obtida durante a passagem da amostra pela resina, FL, fração de lavagem, obtida após a passagem do tampão para retirada de excesso de proteínas. A proteína PyrE-His foi eluída em gradiente crescente de Imidazol. A proteína apresentou um tamanho pouco menor que 30 kDa. A seta indica o início da eluição de pyrE. Posteriormente as frações que apresentaram a maior quantidade de proteínas sem contaminantes foram agrupadas e passaram por diálise ou colunas Hitrap Desalting.

6.2.3. Expressão e Purificação de Rph nativa

A proteína Rph nativa de *A. brasilense* foi expressa em *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pAGRPH a 37°C durante 3 horas, após ter atingido a DO₆₀₀ de 0,6 (Fig. 16A). Vários testes foram realizados a fim de melhorar a expressão de Rph nativa. Foram realizados testes a 37°C por 3 horas e a 16°C *overnight*. No entanto, a expressão durante a noite parece ter inibido completamente a expressão.

Para a purificação de Rph nativa foi realizado um teste de resina, onde as resinas SP, DEAE e Heparina foram incubadas com o extrato bruto sonicado da indução da proteína e eluídos em alta concentração de sal. Esperava-se encontrar uma resina capaz de ligar toda ou a maior parte da proteína de interesse, e que a mesma fosse eluída na presença de alto sal. Após a análise do gel de SDS-PAGE observou-se que Rph não ficou adsorvida nas resinas SP e DEAE (Figura 16B) sendo possível notar a banda referente a proteína (indicada pelas setas) presente na FNL (fração não ligada). A proteína Rph ligou-se com certa afinidade a resina de heparina e foi eluída com tampão TP2 (Tris HCl 50mM, NaCl 1M, pH 8,0) sem muitas proteínas contaminantes, portanto, esta foi a resina escolhida para a purificação em maior escala.

Harlow e colaboradores (2004) purificaram um triplo mutante de Rph de *Bacillus subtilis* em resina de DEAE. É possível que os aminoácidos mutados tenham alterado a capacidade de ligação a resina ou mesmo que Rph de *A. brasilense* não tenha as mesmas características da Rph de *B. subtilis*. Bralley e colaboradores (2006) utilizaram resina Q e Phenyl-Sepharose, a primeira foi testada neste trabalho (dados não mostrados), mas Rph não foi capaz de se ligar na mesma.

Entretanto também é importante salientar que os tampões usados na cromatografia são importantes agentes na ligação a resinas, pois a alteração do sal ou do pH altera características das proteínas (grupos ionizáveis, camada de solvatação, etc), consequentemente alterando a ligação da mesma as resinas. Kelly e Deutscher (1992) utilizaram TrisHCl pH 7,2, Harlow e colaboradores (2004) utilizou tampão MES, pH 6,0 e posteriormente trocou o tampão para pH 7,6, entretanto trabalhos mais recentes tem utilizado Tris-HCl pH 8,0 como tampão (Martínez *et al.*, 2014).

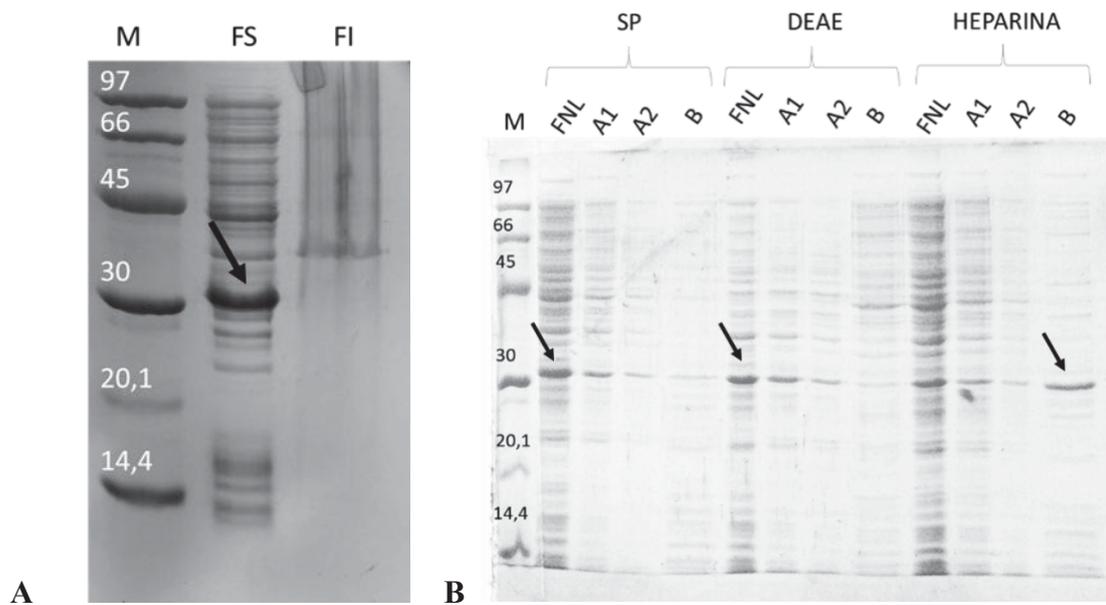


Figura 16. Perfil eletroforético da expressão e da propriedade de ligação em resinas de Rph nativa de *Azospirillum brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomassie R-250. **(A)** Perfil de expressão de Rph nativa a 37°C durante 3 horas após indução com IPTG. M, marcado de peso molecular representado em kDa, FS, fração solúvel obtida após sonicação e centrifugação, FI, fração insolúvel obtida após sonicação e centrifugação. A seta indica a banda de expressão obtida para a proteína Rph. **(B)** Teste de ligação a resinas realizado para Rph nativa. M, marcador de peso molecular representado em kDa. FNL, fração não ligada. A1, primeira lavagem com TP1 (Tris HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8,0). A2, segunda lavagem com TP1. B, tampão de eluição, TP2 (Tris HCl 50mM, NaCl 1 M, pH 8,0), para cada resina SP, DEAE, Heparina, (CM e Q não mostradas). As setas indicam em SP e DEAE a proteína Rph na fração não ligada e em Heparina indica a proteína Rph na fração de eluição.

A purificação de Rph nativa foi realizada em coluna HiTrap Heparina (GE Healthcare) pré equilibrada com tampão TP1 (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8,0). A coluna foi carregada com a fração solúvel de Rph e coletada a fração não ligada (FNL), seguida de lavagem com o tampão TP1, e coletada a fração de lavagem (FL). A eluição da proteína representada na figura 17 foi realizada em tampão com gradiente crescente de NaCl (100mM a 1M). A seta na figura 17 representa a primeira fração onde Rph começou a ser eluída. Esta fração e as duas seguintes foram coletadas, carregadas em coluna Desalting em tampão Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, glicerol 10% (v/v). As frações obtidas foram aliqüotadas, armazenadas a -20°C e quantificadas por Bradford.

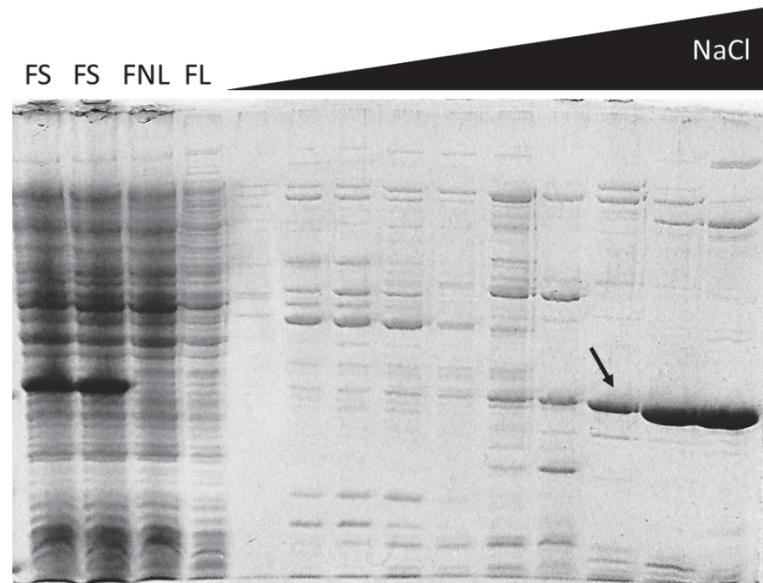


Figura 17. Perfil eletroforético da purificação da proteína Rph nativa de *Azospirillum brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomassie R-250. A purificação de Rph nativa foi realizada em colunas Hitrap- Heparina equilibrada em tampão TP1 e as frações eluídas com gradiente de NaCl. FS, fração solúvel após sonicação, FNL, fração não ligada, obtida durante a passagem da amostra pela resina, FL, fração de lavagem. A seta indica o começo da eluição da proteína Rph. A proteína apresentou um tamanho pouco maior que 30 kDa, como esperado.

Harlow e colaboradores (2004) purificaram Rph de *B. subtilis* com uma estratégia de quatro passos, precipitação com sulfato de amônio, resina de DEAE e posterior resina de hidroxiapatita e gel filtração em Sephacryl S300. Neste trabalho foi considerado que a purificação mostrada na figura 19 era suficiente para a realização dos ensaios iniciais de coprecipitação. Entretanto este protocolo precisará ser alterado futuramente, com adição de uma etapa de gel filtração, para retirada dos contaminantes.

6.2.4. Expressão e purificação de PyrE nativa

PyrE nativa de *A. brasilense* foi altamente expressa em *E. coli*, como indicado pela seta na figura 18A. Para o teste de ligação à resina de PyrE, foram utilizadas as resinas, SP, DEAE, Heparina, CM e Q. Na literatura a proteína PyrE foi purificada em diversas resinas diferentes: OMP-Sepharose em apenas um passo (WITTE *et al.*, 1999), DEAE, após fracionamento com sulfato de amônio (BHATIA *et al.*, 1990), Q-XL 16/10 (BREDA *et al.*, 2012). Em nossos ensaios, PyrE não se ligou as resinas SP e CM, aparecendo na fração não ligada, indicada pela seta na figura 18B e C, mas se ligou com afinidade as resinas DEAE, Q e heparina. A resina de

heparina foi escolhida para realizar a purificação devido a sua eficiência na ligação e menor quantidade de contaminantes nas frações de eluição (Figura 18B e C).

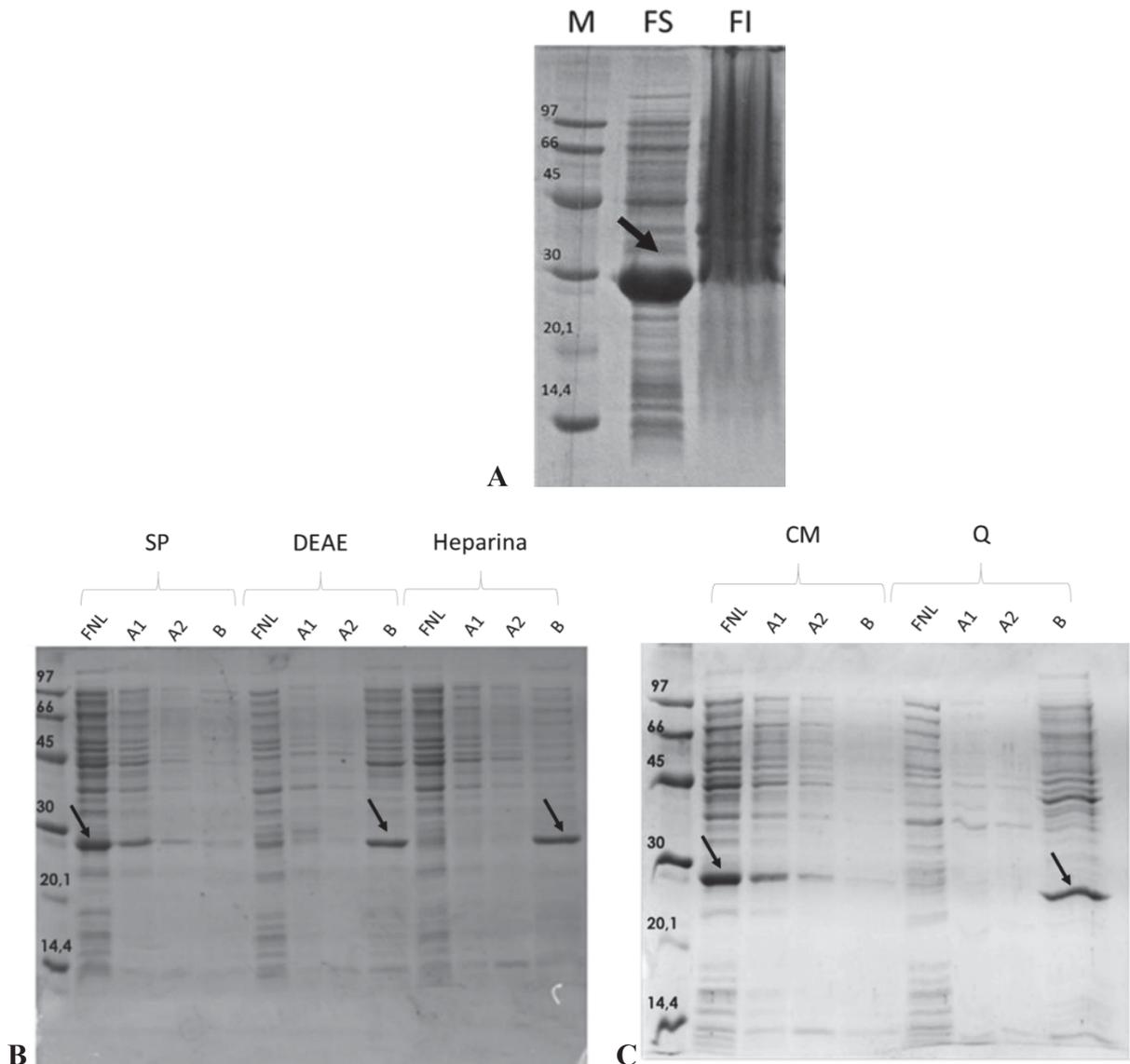


Figura 18. Perfil eletroforético da expressão e da propriedade de ligação em resinas de PyrE nativa de *Azospirillum brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomassie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa. **(A)** Perfil de expressão de PyrE nativa a 37°C durante 3 horas após indução com 0,5M de IPTG. É possível observar uma banda de super expressão próxima a 30 kDa. M, marcador de peso molecular, FS, fração solúvel obtida após sonicação e centrifugação, FI, fração insolúvel obtida após sonicação e centrifugação. **(B)** Teste de ligação a resinas realizado para Rph nativa. M, marcador. FNL, fração não ligada. A1, primeira lavagem com TP1. A2, segunda lavagem com TP1. B, tampão de eluição, TP2, para cada resina testada, SP, DEAE e Heparina. **(C)** continuação do teste de resina com Rph nativa. M, marcador. FNL, fração não ligada. A1, primeira lavagem com TP1. A2, segunda lavagem com TP1. B, tampão de eluição, TP2, para cada resina testada CM e Q.

Para a purificação da proteína PyrE nativa foi utilizada a coluna HiTrap Heparina pré equilibrada com tampão TP1 (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8,0). Henriksen e colaboradores (1996) determinaram para PyrE de *E. coli* que na presença de sulfato de sódio e sulfato de amônio, quando em concentrações próximas de 40-50 mM, ocorre uma inibição na

atividade de PyrE de aproximadamente 50%, o mesmo não foi observado para cloreto de sódio, que em 0,2 M causou pouca ou nenhuma inibição, por isso optou-se por utilizar o cloreto de sódio neste trabalho. A fração solúvel do extrato expressando PyrE foi carregada na coluna pré equilibrada e foram coletadas as frações não ligadas (FNL), fração de lavagem (FL) e posteriormente as frações da eluição com gradiente crescente de NaCl (100 mM a 1 M) (Figura 19). As frações que apresentaram maior quantidade de proteínas e menor concentração de contaminantes foram agrupadas e passaram para a etapa de gel filtração, tanto para a retirada de sal quanto de outros contaminantes, como realizado em outros trabalhos (BREDA *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015).

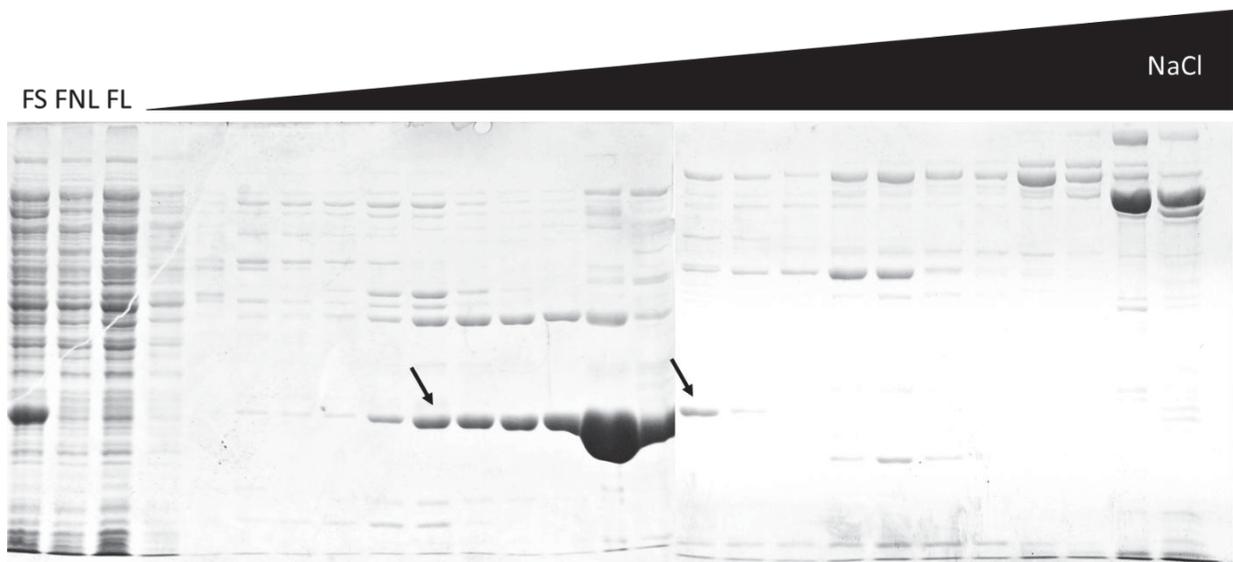


Figura 19. Perfil eletroforético da purificação da proteína PyrE nativa de *Azospirillum brasilense*. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% corado com azul de coomassie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa. A purificação de PyrE nativa foi realizada em colunas Hitrap- Heparin equilibrada em tampão TP1 e as frações eluídas com gradiente de NaCl. M, marcador. FS, fração solúvel após sonicação, FNL, fração não ligada, obtida durante a passagem da amostra pela resina, FL, fração de lavagem, obtida após a passagem do tampão para retirada de excesso de proteínas. As setas indicam o início da eluição da proteína e o final, respectivamente da esquerda para a direita. A proteína apresentou um tamanho pouco menor que 30 kDa, como esperado. Posteriormente as frações indicadas pelas setas e entre elas foram agrupadas e carregadas em coluna de gel filtração.

As frações coletadas na etapa anterior foram carregadas em coluna Sephacryl S-200 pré equilibrada com tampão TPG1 (Tris HCl 50mM, NaCl 100mM, Glicerol 10%) e as frações mais puras foram coletadas, aliquotadas e quantificadas.

Foi ainda realizada uma gel filtração analítica, a fim de se determinar a massa molecular e estado oligomérico de PyrE. A figura 20 mostra o perfil de eluição de PyrE em coluna Superose 6 10/30 detectado por sistema UV a 280 nm. O pico de eluição da proteína se mostrou homogêneo, com seu ápice indicado pela seta, próximo de 15 ml de eluição. A massa calculada

para este pico é de 85 kDa. Como cada monômero de PyrE apresenta 25,7 kDa, a massa calculada para o pico sugere uma estrutura quaternária entre um trîmero e um tetrâmero. Visto que a estrutura terciária de PyrE é bem conservada e geralmente se apresenta na forma de dîmero (BATHIA *et al.*, 1990; SCAPIN *et al.*, 1993; BREDA *et al.*, 2012; DONINI *et al.*, 2017).

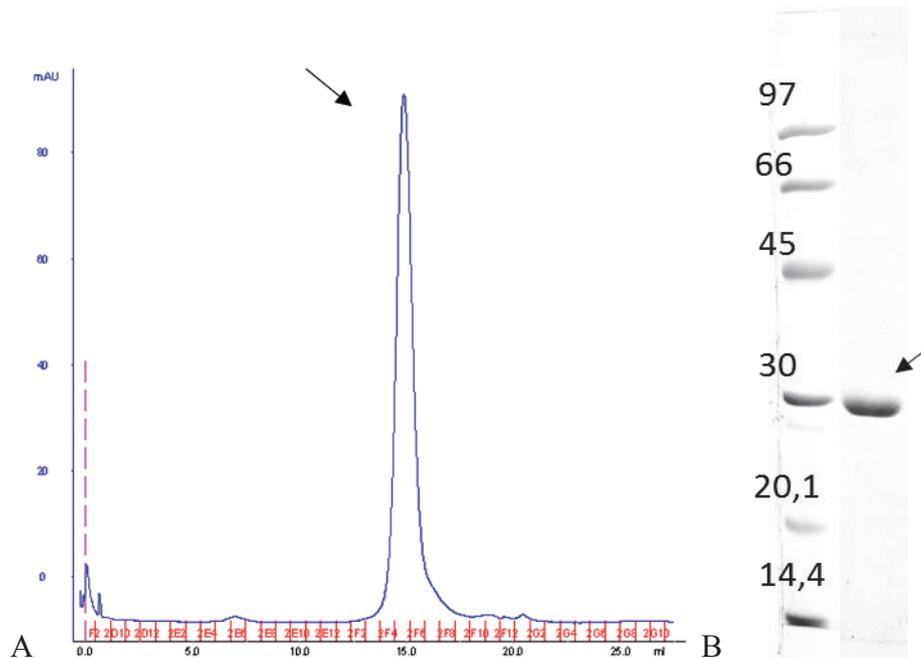


Figura 20. Perfil de PyrE em Superose 6. Foi realizada uma cromatografia analítica em coluna Superose 6 10/30 (GE Healthcare) em tampão Tris 50mM, NaCl 100mM e Glicerol 5%, pH 8,0. Foi utilizado um marcador de peso molecular da BioRad: Tiroglobulina (670 kDa), Gama-globulina (158 kDa), Ovoalbumina (44 kDa), Mioglobina (17 kDa) e Vitamina B12 (1,3 kDa). (A) A proteína PyrE parcialmente purificada em coluna HiTrap Heparina (GE Healthcare) e carregada na coluna de superose 6, eluída no tampão supracitado em um fluxo de 0,5 ml/min e o perfil de eluição foi detectado em UV, 280nm. O pico de eluição de PyrE, indicado pela seta, foi detectado próximo de 15 ml, cuja massa calculada é 85,7 kDa (B) perfil eletroforetico de PyrE após passagem em gel filtração, a seta indica a banda referente a PyrE.

6.3. Identificação por MALDI-TOF

As proteínas purificadas neste trabalho foram analisadas por MALDI/TOF a fim de confirmar suas identidades. Os dados de análise estão na tabela 4, onde as proteínas foram positivamente identificadas.

TABELA 4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI/TOF.

Proteína	MM(kDa) ^a	Score ^b	Cobertura ^c	N de picos ^d
Ribonuclease PH-His	26	38.10	17.6	6
Orotato fosforibosiltransferase-His	25,7	109	40.4	10
Orotato fosforibosiltransferase <i>E.coli</i>	23,4	86.6	33.8	7
Orotato fosforibosiltransferase nativa	25,7	124	46.1	13
Ribonuclease PH nativa	26	68.7	21.1	8

*Banco interno de dados Mascot para *Azospirillum brasilense* sp245

*Banco NCBI prot para *Escherichia coli*.

- Massa da proteína encontrada no banco de dados.
- Score
- Porcentagem da amostra identificada.
- Número de picos identificados.

6.4. Ensaios de Co-precipitação de PyrE e proteínas PII

Uma vez purificadas e confirmadas a identidade das proteínas de interesse, foram realizados ensaios de Co-precipitação *in vitro* ou *Pull-down* com resina magnética contendo *beads* de níquel. O princípio dessa técnica é a utilização de uma proteína com cauda de histidina (*his*) que se liga aos *beads*, seguida da adição de uma ou mais proteínas sem cauda de histidina, que podem ou não interagir com a proteína imobilizada (Figura 21). Após sucessivas lavagens, apenas proteínas capazes de interagir com a proteína 6xHis imobilizada permanecem no sistema, e são por fim co-eluídas com a proteína com cauda 6xHis, resultando em duas bandas no gel de eletroforese quando há interação entre as proteínas testadas, ou apenas uma banda equivalente à proteína com cauda 6xHis quando não há interação.

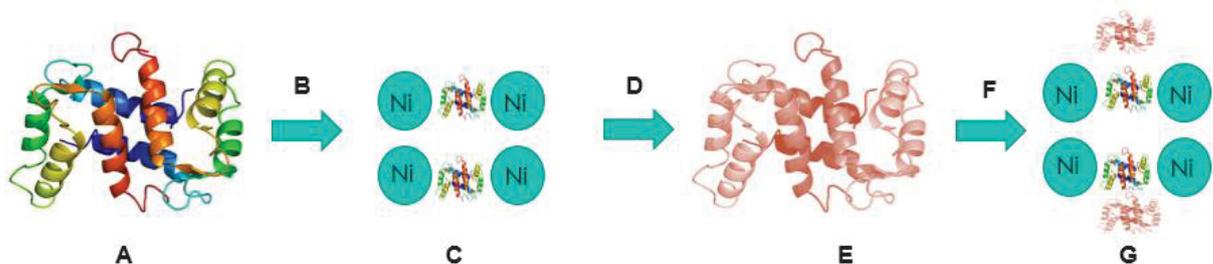


Figura 21. Ilustração de como ocorre o ensaio de co-precipitação (*pull-down*) *in vitro*. Em (A) temos a proteína com cauda de histidina já purificada. (B) a proteína com cauda de histidina é incubada, na presença de tampão, com a resina que possui níquel. (C) a proteína *his* se liga ao níquel da resina, ficando adsorvida. Neste ponto (D) é realizada uma lavagem para retirar o excesso de proteína não ligada a resina. Em (E) a proteína nativa (sem cauda

de histina) é incubada junto com a resina de níquel, onde a primeira proteína ficou adsorvida. Em (F) são realizadas três lavagens sucessivas para eliminar o excesso de proteína não ligada. Em (G) se ocorreu a interação entre as duas proteínas (com cauda de histidina e sem) ambas ficaram ligadas na resina. A resina com as proteínas é então incubada com tampão de amostra e fervida a 100°C durante 5 minutos, e aplicadas em gel de SDS-PAGE. Na análise do gel é possível ver as proteínas que ficaram adsorvidas. No caso da interação apareceram duas bandas no gel, referente a cada uma das proteínas testadas. Além disso, é realizado um controle para cada ensaio de interação realizado, onde a proteína sem cauda de histidina (ou extrato bruto) é incubada com a resina, no mesmo tampão e condições de temperatura e tempo, para análise de ligação inespecífica na resina. Fonte: a autora.

Os primeiros ensaios de co-precipitação foram realizados utilizando-se a proteína His-PyrE e GlnZ, porém sem identificação de formação do complexo. Foram então realizados novos ensaios, para avaliar se a interação ocorreria entre as proteínas His-GlnZ e PyrE nativa. Foram inicialmente realizados testes na presença de 1mM de ADP e ausência ou presença de diferentes detergentes (Figura 22). Os resultados obtidos indicaram que a proteína PyrE se ligava de forma inespecífica na resina de níquel mesmo na ausência de His-GlnZ (Figura 22, linha 1).

A fim de minimizar interações inespecíficas de PyrE com a resina que dificultaria a interpretação dos resultados, foram testados detergentes não desnaturante no tampão utilizado para esta interação. Foram avaliados os detergentes: laurildimetilamina N-óxido (LDAO), Polietileno glicol sorbitano monolaurato (Tween 20), 4-Nonilphenil-polietileno glicol (Nonidet) e 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) phenil-polietilene glicol (Triton X-100), todos na concentração de 0,01% (v/v).

Todos os detergentes testados reduziram a interação inespecífica de PyrE à resina de níquel a ponto de não ser possível detectar mais PyrE nos ensaios controle (na ausência de GlnZ) (Fig. 22, linhas controle). Nesse ensaio foi ainda verificado que quando PyrE foi incubada na presença de His-GlnZ e ADP 1 mM, foi possível detectar a presença de duas bandas após eluição da resina magnética indicando formação do complexo GlnZ-PyrE (Fig. 22). Quando o detergente LDAO foi utilizado, PyrE perdeu parte da capacidade de co-purificar (interagir) com His-GlnZ (Fig. 22). É provável que o LDAO afete a capacidade de interação entre as proteínas devido a alterações estruturais (como por exemplo, desnaturação) ou através da oclusão de sítios de interação na superfície das duas proteínas. Todos os ensaios seguintes foram realizados na presença de 0,01% (v/v) de tween 20.

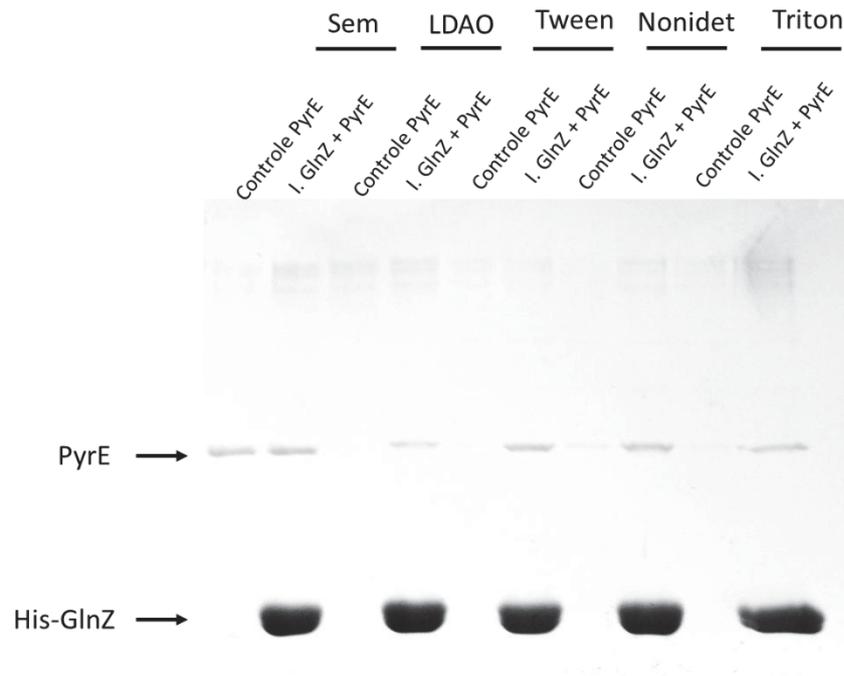


Figura 22. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His e PyrE de *Azospirillum brasilense* na ausência ou presença de diferentes detergentes. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomasie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa e corresponde a primeira linha do gel. Este ensaio foi realizado na presença de 1mM de ADP, na ausência de detergente ou na presença de 0,01% dos detergentes LDAO, TWEEN 20, NONIDET ou TRITON.

Após determinadas às condições ideais para os ensaios de co-precipitação, novos ensaios foram realizados na presença de diferentes combinações das moléculas efetoras de PII. Os resultados apresentados na Figura 25 indicam que PyrE é co-precipitada com His-GlnZ na presença de ADP 1 mM e de forma menos intensa quando na presença de ATP 1 mM. Quando ATP e 2-OG foram combinados não foi possível detectar interação (Fig. 23)

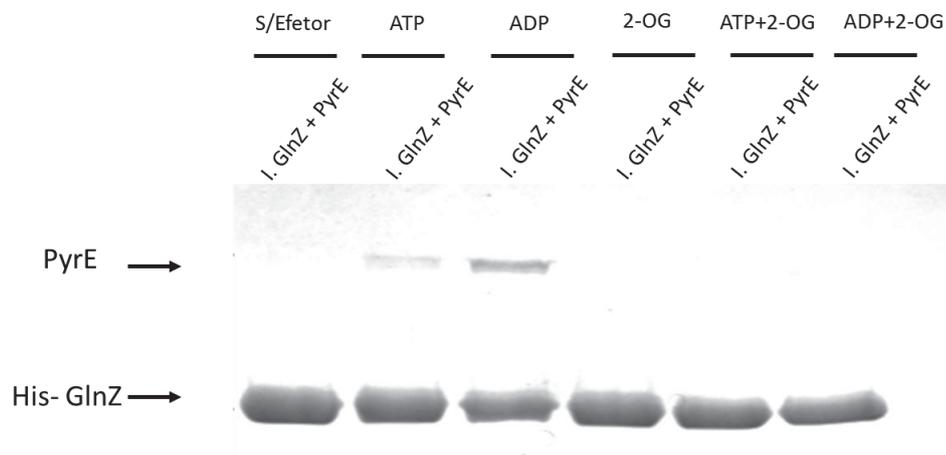


Figura 23. Eletroforese do ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His e PyrE de *Azospirillum brasilense* na ausência ou presença de todos os efetores de PII e suas combinações. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomasie R-250. Para avaliar a interação de His-GlnZ e PyrE sem efector ou na presença de 1mM dos efetores ATP, ADP, 2-OG, ATP + 2-OG e ADP + 2-OG. Bandas são visualizadas na presença de ATP e ADP, sendo a primeira mais fraca que a segunda.

Além da proteína PII His- GlnZ, foram testadas as proteínas GlnB (a segunda proteína PII em *A. brasilense*), mutante GlnZ- Δ loop (com deleção do *loop* T) e GlnZ uridililada (GlnZ-UMP₃). A realização dos ensaios com essas outras proteínas PII poderia nos dar pistas sobre o papel fisiológico da interação entre GlnZ e PyrE e o papel da alça-T de PII nesta interação.

Não foi observada a formação de complexo de GlnB, GlnZ- Δ loop ou GlnZ-UMP com PyrE nos ensaios de co-precipitação (Figura 24). Este resultado indica que a ligação de PyrE é específica com GlnZ, e que a interação não ocorre de forma detectável com GlnB. Apesar da alta similaridade entre GlnB e GlnZ em *A. brasilense* algumas das interações descritas parecem ser bem específicas como é o caso dos complexos DraT-GlnB, DraG-GlnZ e NifA-GlnB (HUERGO *et al.*, 2012).

GlnZ Δ loop não foi capaz de interagir com PyrE (Fig. 24) na presença de ADP ou ATP, sugerindo que a enzima PyrE poderia interagir com a região do *loop* T (alça T) de GlnZ. Isto seria esperado uma vez que a alça T é o sítio de ligação para a maioria dos alvos de PII conhecidos, como ATase, AmtB e NtrB (HUERGO *et al.*, 2013). Porém, é importante ressaltar que a deleção de resíduos da alça T pode também ter afetado a capacidade de GlnZ de ligar seus efetores como observado para a proteína GlnK de *Herbaspirillum seropedicae* (Adriano A. Stefanello, comunicação pessoal).

Também não há formação do complexo GlnZ-PyrE na presença de GlnZ-UMP₃, mais uma vez reforçando que a alça T de GlnZ desempenha um papel importante na interação com PyrE. Este dados também permitem concluir que a formação do complexo PyrE-GlnZ deve ocorrer preferencialmente em situação de alta disponibilidade de amônio, quando a proteína GlnZ está desuridililada (HUERGO *et al.*, 2006).

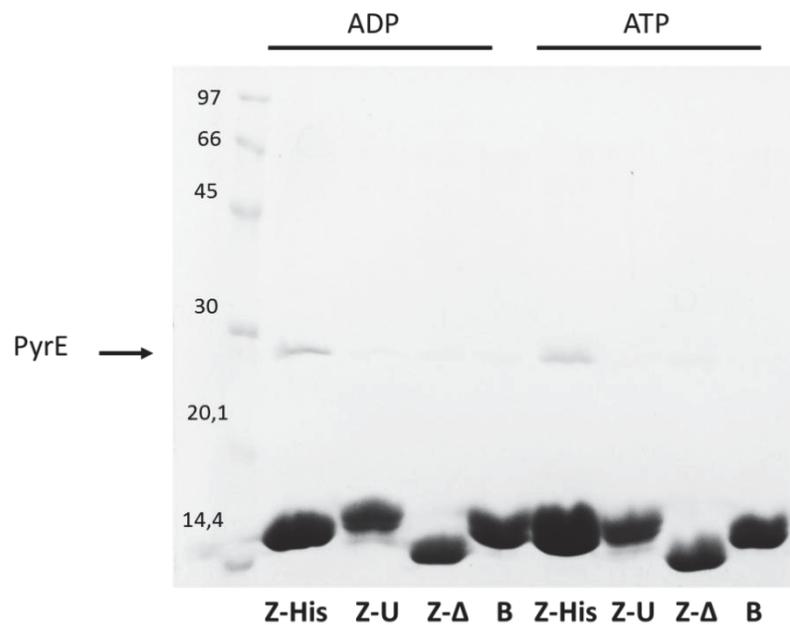


Figura 24. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His, GlnZ- Δ loop, GlnZ- UMP e GlnB-His e PyrE de *Azospirillum brasilense* na presença dos efetores ADP e ATP de PII. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomasie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa e corresponde a primeira linha do gel. Este ensaio foi realizado na presença de 1mM dos efetores ATP e ADP. Os símbolos mostrados na figura representam: Z- His (His-GlnZ); Z-U (GlnZ-UMP); Z- Δ (GlnZ- Δ loop) e B (GlnB).

Para entender mais sobre o efeito da concentração dos efetores sobre a interação de GlnZ e PyrE foram realizados ensaios com concentração variadas de ADP (Figura 25) e ATP (Figura 26). O ensaio com curva de ADP demonstrou que mesmo em concentrações muito baixas como 10 μ M o ADP já é capaz de estimular a interação entre GlnZ e PyrE. A interação é estabilizada a partir de 100 μ M de ADP (Fig. 25). Ensaio de microcalorimetria indicam que a ligação de ADP aos 3 sítios de GlnZ ocorre de forma não cooperativa com Kd entre 20-39 μ M (TRUAN *et al.*, 2014). Assim, é bem provável que a partir de 100 μ M de ADP a maior parte dos trímeros de GlnZ estejam saturados com ADP, favorecendo a interação com PyrE.

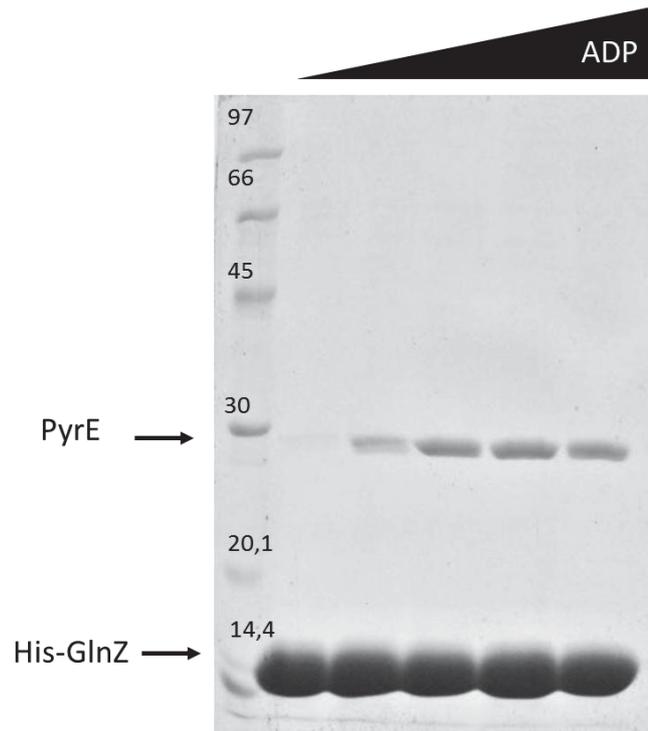


Figura 25. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com His-GlnZ e PyrE de *Azospirillum brasilense* na presença de diferentes concentrações de ADP. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomassie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa e corresponde a primeira linha do gel. Ensaio realizado nas concentrações respectivas de ADP, 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M e 5000 μ M.

No ensaio de variação na concentração de ATP (Figura 26) foi possível detectar interação na presença deste nucleotídeo, porém a quantidade de PyrE co-purificada com His-GlnZ foi visualmente menor que nos ensaios na presença de ADP (Fig. 25). O ATP apresentou um efeito estimulatório máximo a 0,1 mM (Fig. 26), porém, curiosamente uma menor estimulação na formação do complexo ocorreu em 1 mM (Fig. 26). Ensaio de microcalorimetria indicam que a ligação de ATP aos 3 sítios de GlnZ ocorre de forma não cooperativa com Kd 150 μ M (TRUAN *et al.*, 2014). Uma possível explicação seria que na concentração de 0,1mM de ATP o trímero de GlnZ não esteja totalmente saturado (com 3 ATPs ligados) facilitando a interação com PyrE. Por outro lado, quando em 1mM de ATP, os 3 sítios de ligação de nucleotídeos da GlnZ estariam ocupados por ATP reduzindo a afinidade do complexo entre GlnZ e PyrE.

No ambiente celular os nucleotídeos ATP e ADP estão presentes simultaneamente e sua razão pode variar de acordo com o estado metabólico da célula. Assim, foram realizados ensaios variando a razão ATP/ADP, mas mantendo a concentração final total de nucleotídeos em 1 mM.

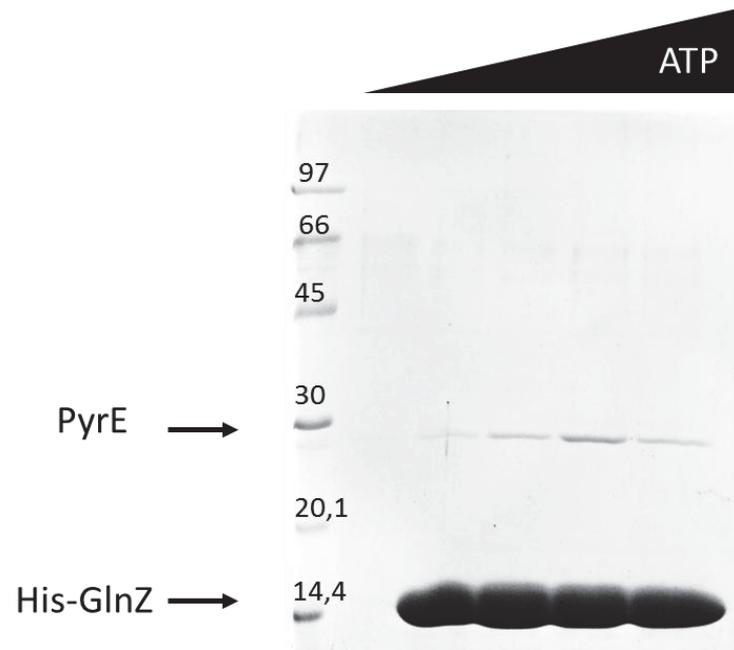


Figura 26. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His e PyrE de *Azospirillum brasilense* na presença de diferentes concentrações de ATP. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomasie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa e corresponde a primeira linha do gel. Ensaio realizado nas concentrações respectivas de ATP, 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M. Em geral, nos ensaios de concentração fixa de efetor, é utilizado 1mM (1000 μ M) do mesmo. Neste ensaio é possível observar que todas as bandas possuem a mesma intensidade e a mesma é muito próxima a do controle (não mostrado).

Na figura 27 é possível observar uma pequena diminuição da interação de GlnZ e PyrE à medida que a concentração de ADP diminui e a concentração de ATP aumenta, porém, a interação não deixa de ocorrer em nenhuma das condições testadas sugerindo que as variações na razão ATP /ADP não são os principais responsáveis pela controle do complexo GlnZ – PyrE.

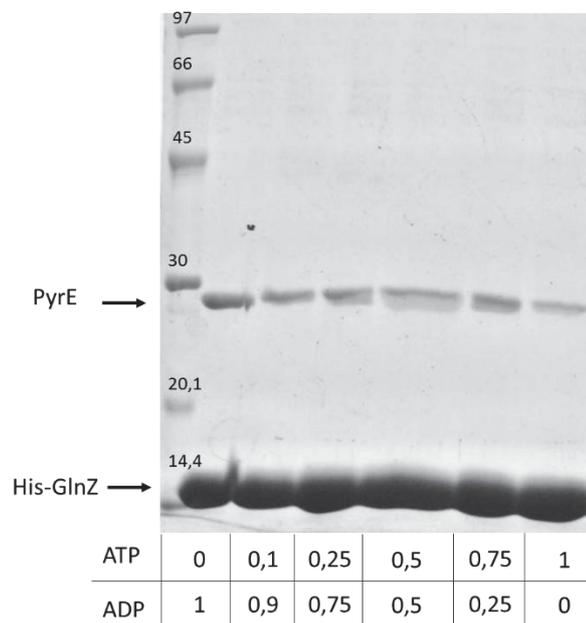


Figura 27. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His e PyrE de *Azospirillum brasilense* na presença de diferentes taxas de ATP/ADP. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomassie R-250. O marcador de peso molecular está representado em kDa e corresponde a primeira linha do gel. Os valores mostrados na tabela correspondem a concentração em mM dos efetores utilizados no ensaio. Neste ensaio é possível visualizar a diminuição da interação de GlnZ-His e PyrE quando há um aumento na concentração de ATP.

As concentrações de 2-OG podem alterar de forma muito significativa a afinidade de GlnZ por ATP e ADP, sendo que em altas concentrações de 2-OG a ligação de ATP é favorecida (TRUAN *et al.*, 2014; GERHARDT *et al.*, 2012). Assim, foram realizados ensaios de interação entre GlnZ e PyrE na presença de razões variadas de ATP/ADP juntamente com as diferentes concentrações fisiológicas de 2-OG.

Na presença de ATP 1mM, a presença de 2-OG mesmo em baixas concentrações inibe a formação do complexo GlnZ-PyrE (Figura 28). A medida que a razão ATP/ADP diminui há um estímulo na formação do complexo GlnZ-PyrE desde que os níveis de 2-OG sejam baixos (0,01 mM). O aumento nos níveis de 2-OG para 0,1 e 2 mM desestabiliza a formação do complexo GlnZ-PyrE (Fig 28). Apenas na ausência total de ATP e presença de ADP 1 mM o complexo GlnZ-PyrE é formado em 0,1 mM de 2-OG mas não em 2 mM de 2-OG. Estes dados indicam que os níveis de 2-OG exercem um papel no controle da estabilidade do complexo GlnZ-PyrE de forma semelhantes aos resultados descritos para os complexos GlnZ-DraG e GlnZ-AmtB em *A. brasilense* (GERHARDT *et al.*, 2012). Na presença de elevados níveis de ATP o efeito sinérgico deste nucleotídeo com a ligação a 2-OG deve facilitar a ligação de 2-OG na proteína GlnZ inibindo a interação entre GlnZ e PyrE.

Um fato curioso é a inibição da formação do complexo GlnZ-PyrE na presença de apenas ADP 1 mM combinado com 2-OG 2 mM (Fig. 28, última linha direita). Dados estruturais e de microcalorimetria sugerem que 2-OG não é capaz de ligar a GlnZ na presença de ADP (TRUAN *et al.*, 2010; TRUAN *et al.*, 2014). O ADP utilizado no ensaio tem pureza de 95% (Sigma), trabalhos anteriores de nosso grupo indicam contaminação de 1,6% de ATP no reagente fornecido por este fabricante (GERHARDT *et al.*, 2012). Assim, quando a proteína GlnZ é incubada em uma solução de ADP 1 mM, a reação pode conter até 20 μ M de ATP. Como 2-OG e ATP ligam na GlnZ de forma sinérgica (TRUAN *et al.*, 2014), é possível que nestas condições parte da população de GlnZ esteja ocupada por Mg.ATP + 2-OG e isto seja responsável pela inibição da formação do complexo com PyrE.

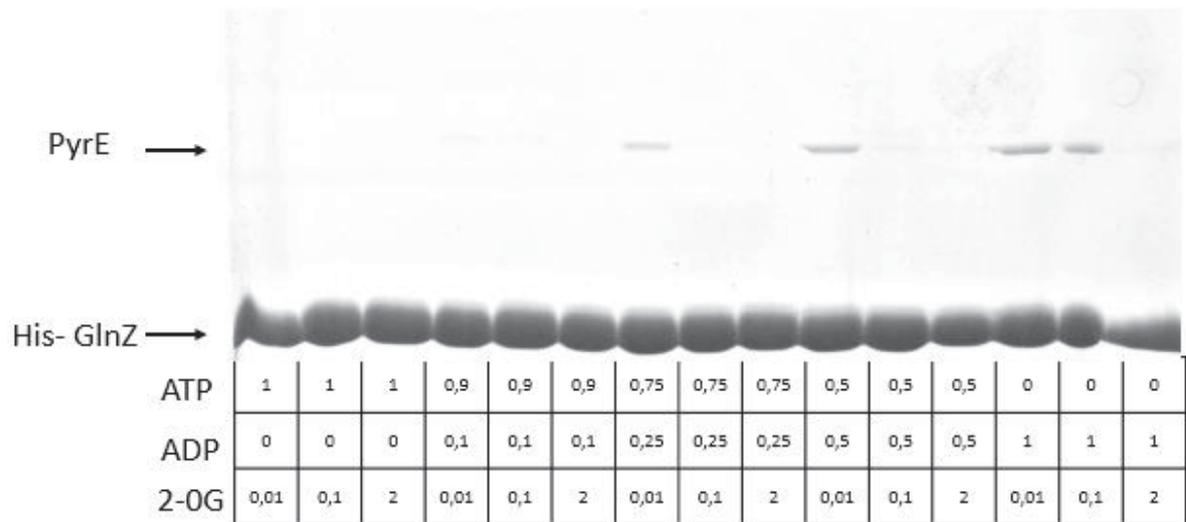


Figura 28. Eletroforese do ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His e PyrE de *Azospirillum brasilense* na presença de diferentes taxas de ATP/ADP e concentrações de 2-OG. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomassie R-250. Os valores mostrados na tabela correspondem a concentração em mM dos efetores utilizados no ensaio. Neste ensaio é possível visualizar a interação de GlnZ-PyrE na presença de ADP, mas não quando as concentrações de ATP e 2-OG são altas.

Os dados de interação indicam que o complexo GlnZ-PyrE deve ser preferencialmente formando em condições onde há ampla disponibilidade de glutamina (favorecendo a desuridilação de GlnZ) e baixos níveis de 2-OG (favorecendo ligação de ADP na GlnZ). Estas condições são exatamente as encontradas em Proteobactérias quando recebem um choque de amônio ou estão em altas concentrações de amônio (HUERGO E DIXON, 2015). Apesar de ainda não termos dados sobre o papel da proteína GlnZ sobre a atividade de PyrE é possível especular que a interação seja responsável pela ativação de PyrE em resposta a um choque de amônio ou mesmo em altas concentrações, favorecendo biossíntese de pirimidinas quando amônio está mais disponível. Porém, devido a capacidade do complexo GlnZ-PyrE em responder também as concentrações de 2-OG e relação ATP/ADP o mecanismo de regulação de PyrE por GlnZ pode ser muito mais complexo e requer mais investigação.

Tendo em vista os ensaios apresentados neste trabalho é possível concluir que GlnZ e PyrE interagem *in vitro*. A regulação de PyrE por PII sugere um papel das proteínas sinalizadoras no metabolismo de pirimidinas. PyrE é responsável por catalisar uma reação irreversível da via de síntese “de novo” de pirimidinas, onde ocorre a incorporação do PRPP.

O PRPP (fosforibosil pirofosfato) é utilizado como esqueleto para a síntese “de novo” não só de pirimidinas como também de purinas, além das vias de salvamento de ambas bases nitrogenadas (KILSTRUP *et al.*, 2005). A via de síntese “de novo” de purinas leva a formação de AMP e GMP, e é iniciada pela transferência de grupos amino da glutamina para o 5-

fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) catalizada pela enzima PurF, conservada em todos os microrganismos (NEUHARD, NYGAARD, 1987; MOFFATT; ASHIHARA, 2002). O primeiro intermediário de importância nesta via é o IMP (inositol) sintetizado em 10 passos a partir do carbono em posição 1 do anel do PRPP (Fig. 29). O PRPP é capaz de regular a enzima PurR, que por sua vez regula a via de síntese “de novo” de purinas e PyrR em bactérias gram positivas. As α -proteobactérias não apresentam essas proteínas reguladoras (HOVE-JENSEN *et al.*, 2017).

Além da proteína PyrE, outras proteínas relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos foram encontradas no trabalho realizado por Gerhardt (2015), como por exemplo, a enzima fosforibosilaminoimidazol- succinocarboxiamida sintetase (*purC*), enzima da síntese “de novo” de purinas, a adenina deaminase (*ade*), envolvida na via de salvamento de purinas e GMP redutase (*guaC*), que catalisa a conversão de GMP a IMP (Fig. 29). A presença de todas essas proteínas pode sugerir que o papel de PII no metabolismo de nucleotídeos pode ser amplo.

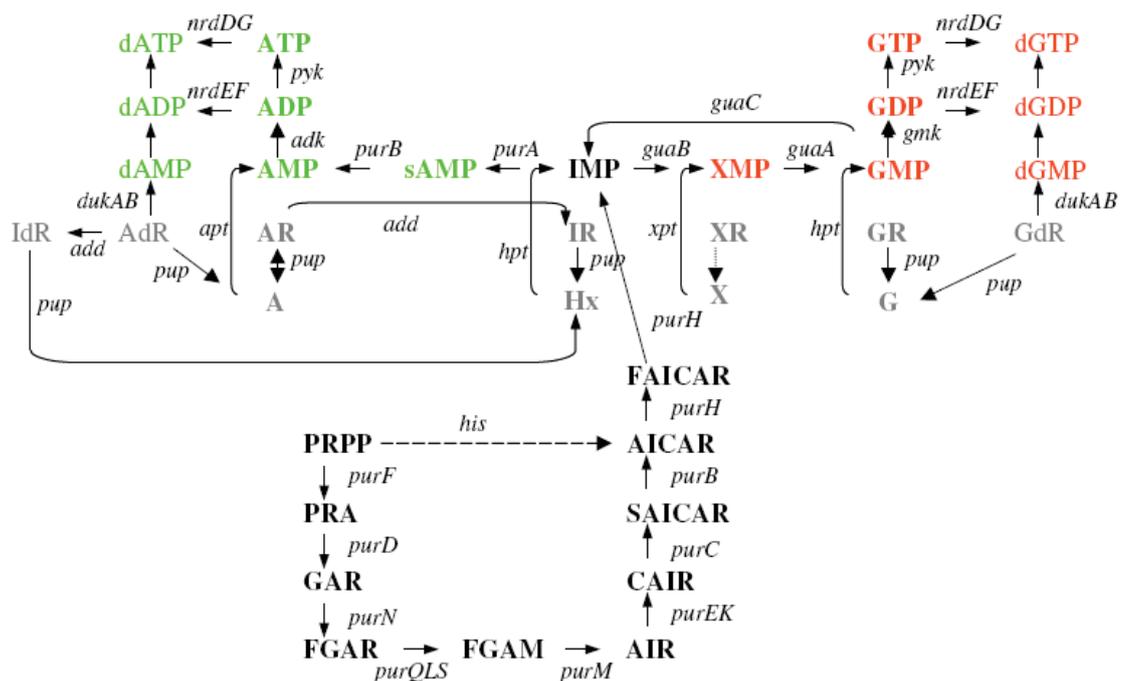


Figura 29. Via de Síntese “De novo” e Salvamento de Purinas em *L. lactis*. As enzimas estão representadas pelos respectivos gene, e as setas indicam a direção das reações. Seguem as abreviaturas das siglas em inglês: PRPP (fosforibosil pirofosfato); PRA (fosforibosilamina), GAR (ribonucleotídeo de glicinamina), FGAR (ribonucleotídeo de formilglicinamina), FGAM (ribonucleotídeo de formilglicinamidina), AIR (ribonucleotídeo de aminoimidazol), CAIR (carboxiaminoimidazol fosforibosil), SAICAR (ribonucleotídeo de carboxiaminoimidazol succinocarboxiamida), AICAR (ribonucleotídeo de carboxiamida aminoimidazol), FAICAR (ribonucleotídeo de carboxiamida formaminoimidazol), A (adenina), Hx (hipoxantina), X (xantina), G (guanina), IdR (deoxiinosina), AdR (deoxyadenosina), AR (adenosina), IR (inosina), XR (xantosina), GR (guanosina), GdR (deoxyguanosina), sAMP (adenilsuccinato), IMP (inosina monofosfato), XMP (xantosina monofosfato). Enzimas codificadas pelos respectivos genes em ordem alfabética: *add* (adenosina deaminase), *adk* (adenilato quinase ou AMP quinase), *apt* (adenina fosforibosiltransferase), *dukAB* (deoxinucleosídeo quinase), *gmk* (guanilato quinase ou GMP quinase), *guaA* (GMP sintetase), *guaB* (IMP desidrogenase), *guaC* (GMP

redutase), *hpt* (hipoxantina/guanina fosforibosiltransferase), *nrdDG* (ribonucleotideo trifosfato redutase anaeróbica), *nrdEF* (ribonucleotideo difosfato redutase anaeróbica), *pup* (nucleosideo de purina fosforilase), *purA* (adenilosuccinato sintetase), *purB* (adenilosuccinato liase), *purC* (SAICAR sintetase), *purD* (GAR sintetase), *purEK* (CAIR sintetase), *purF* (PRPP aminotransferase), *purH* (bifuncional AICAR transformilase/IMPciclohidrolase), *purM* (AIR sintase), *purN* (GAR transformilase), *purQSL* (FGAM sintetase), *pyk* (piruvato quinase) e *xpt* (xantina fosforibosiltransferase). Fonte: Kilstrup *et al.*, 2005.

O papel de PII no metabolismo de nucleotídeos ainda é desconhecido, podendo ter relação com PRPP e a distribuição deste metabólito nas vias de síntese de nucleotídeos e aminoácidos. Entretanto as respostas para as perguntas levantadas neste trabalho só poderão ser respondidas com o estudo mais aprofundado da cinética de PyrE na ausência e na presença de PII.

Além disso, é importante salientar que a primeira enzima da via de síntese “de novo” de pirimidinas, a CPS (carbamoil fosfato sintetase) é também a primeira enzima da síntese de arginina. Em cianobactérias a interação entre PII e NAGK (enzima que faz parte da via de síntese da arginina) é um alvo bem caracterizado de PII (FORCHHAMMER, 2004; FORCHHAMMER, 2008). A enzima NAGK foi detectada no ensaio realizado por Gerhardt (2015), podendo ser um alvo de PII também em *A. brasilense*, sugerindo uma nova hipótese, onde as proteínas PII poderiam regular a direção do carbamoil fosfato, para as vias de síntese “de novo” de pirimidinas ou para a via de síntese da arginina.

6.5. Ensaios de Co-precipitação entre Rph e GlnZ

Assim como para PyrE, os primeiros ensaios de interação foram realizados entre His-Rph e GlnZ, porém sem detecção de formação de complexo. É interessante destacar que nos ensaios realizados por Gerhardt (2015) foi utilizada His-GlnZ imobilizada em coluna de níquel, e todas as proteínas identificadas como possíveis alvos estavam em sua conformação nativa (sem adição de cauda). É possível que a utilização de cauda de histidina nos possíveis alvos possa de alguma forma interferir na estrutura dessas proteínas ou ainda ocluir o possível sítio de interação com PII quando elas se ligam à resina de níquel. Dessa forma, foram também realizados ensaios utilizando His-GlnZ e Rph nativa.

Os ensaios para avaliar a interação entre as proteínas His-GlnZ e Rph nativa foram realizados na presença de diferentes combinações de efetores de PII. Resultados preliminares apresentados na figura 30 indicam interação entre Rph e GlnZ na presença de ADP 1mM. Nas demais condições as fracas bandas de Rph que aparecem no gel original são muito similares as

observadas no controle onde apenas Rph foi incubada com a resina sem His-GlnZ (dados não mostrados).

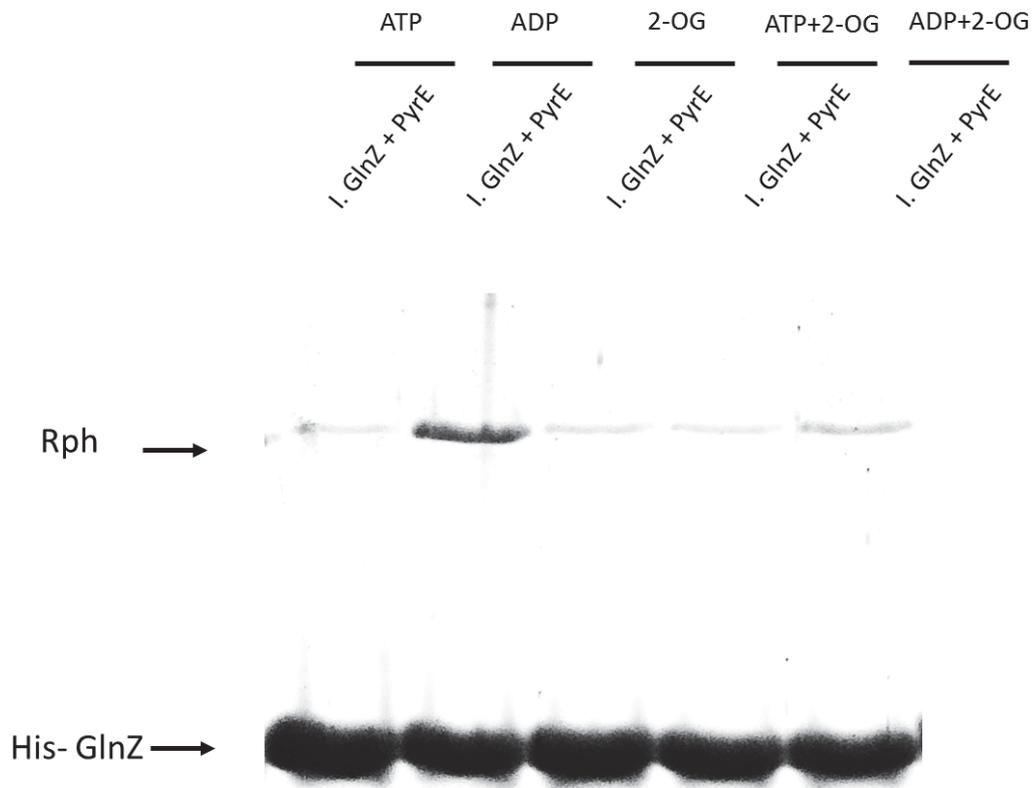


Figura 30. Eletroforese do ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com His-GlnZ e Rph de *Azospirillum brasilense* na presença de todos os efetores de PII e suas combinações. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomassie R-250. Ensaio preliminar para avaliar a interação de His-GlnZ e Rph na presença de 1mM dos efetores ATP, ADP, 2-OG, ATP + 2-OG e ADP + 2-OG. A interação se refere a incubação das proteínas GlnZ-His e Rph juntas. É possível observar uma banda referente a Rph na interação que ocorreu na presença de 1mM de ADP.

A fim de minimizar a ligação inespecífica de Rph na resina de níquel, ensaios foram realizados na presença de detergentes não desnaturantes. Estes ensaios revelaram que a interação entre a Ribonuclease PH e GlnZ é prejudicada na presença de detergentes como pode ser observado pela redução das bandas de Rph nas linhas LDAO, Tween 20, Nonidet e Triton da figura 31. Estes dados indicam que interações hidrofóbicas podem estar envolvidas no contato entre GlnZ e Rph.

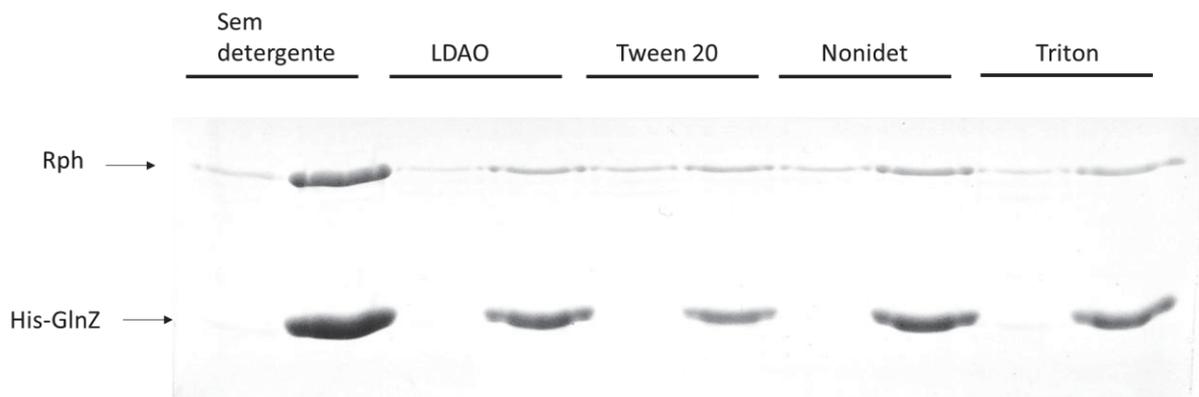


Figura 31. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com His-GlnZ e Rph de *Azospirillum brasilense* na ausência ou presença de diferentes detergentes. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomassie R-250. O detergente faz parte do tampão utilizado no ensaio, como especificado na metodologia do trabalho, o mesmo tem como função diminuir a ligação inespecífica da proteína sem cauda de histidina na resina de níquel. Este ensaio foi realizado na presença de 1mM de ADP, na ausência de detergente ou na presença de 0,01% (v/v) dos detergentes LDAO, TWEEN 20, NONIDET ou TRITON. Optou-se por não utilizar detergente, visto que a ligação inespecífica de Rph na resina não é grande quando comparada com a banda da interação.

A interação entre Rph e GlnZ foi avaliada na presença de diferentes concentrações de ADP (figura 32). O resultado indica uma forte indução da formação do complexo a partir de 100 μ M de ADP. Em concentrações acima deste valor o complexo parece se manter estável. Estes resultados são muito similares aos observados com o complexo GlnZ-PyrE e se correlaciona bem com a Kd para ligação de ADP na proteína GlnZ de 20-39 μ M (TRUAN *et al.*, 2014).

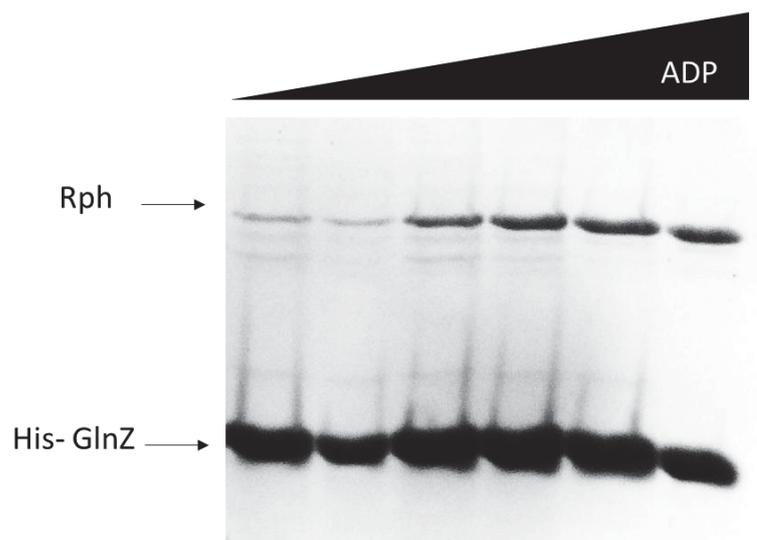


Figura 32. Ensaio de Co-precipitação (*Pull Down*) *in vitro* com GlnZ-His e Rph de *Azospirillum brasilense* na presença de diferentes concentrações de ADP. As análises foram realizadas em géis de acrilamida 12,5% e corados com azul de coomassie R-250. Ensaio realizado nas concentrações respectivas de ADP, 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M e 5000 μ M.

Os dados apresentados indicam que a interação entre Rph e GlnZ segue o mesmo padrão do observado para o complexo PyrE-GlnZ. Assim, o complexo Rph-GlnZ também deve ser favorecido após um choque de amônio ou altas concentrações de amônio. Inferências sobre a função da formação deste complexo ainda são muito especulativas uma vez que ainda não conhecemos quais são os substratos da RNase PH *in vivo* (tipos de RNAs) e qual o efeito da interação com GlnZ na atividade da RNase. De qualquer forma, é muito provável que esta interação sirva como modulador da atividade enzimática da RNase e isto pode representar um grande avanço na compreensão da regulação do metabolismo de RNA uma vez que há pouca informação a respeito da regulação da atividade de RNases.

Vale ressaltar que além da Ribonuclease PH, outras ribonucleases foram encontradas no trabalho de Gerhardt (2015) como possíveis alvos de interação com a proteína GlnZ: a ribonuclease R (envolvida principalmente na degradação de mRNA e RNA estável) e a ribonuclease G (envolvida na degradação de mRNA e na maturação de RNA). Portanto, é possível que as proteínas PII atuem como sensores do estado nutricional da célula controlando o catabolismo de várias formas de RNA.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, um modelo de regulação de Orotato fosforibosiltransferase e Ribonuclease PH foi proposto (Fig. 33), onde ambas as proteínas interagem com GlnZ em condições de choque de amônio. Em condições de limitação de nitrogênio fixado sabe-se que PyrE e GlnZ não formam complexo, entretanto essa relação ainda é desconhecida para Rph. Mais estudos precisam ser realizados a fim de caracterizar melhor a interação entre essas proteínas, e entender o papel das proteínas PII no metabolismo.

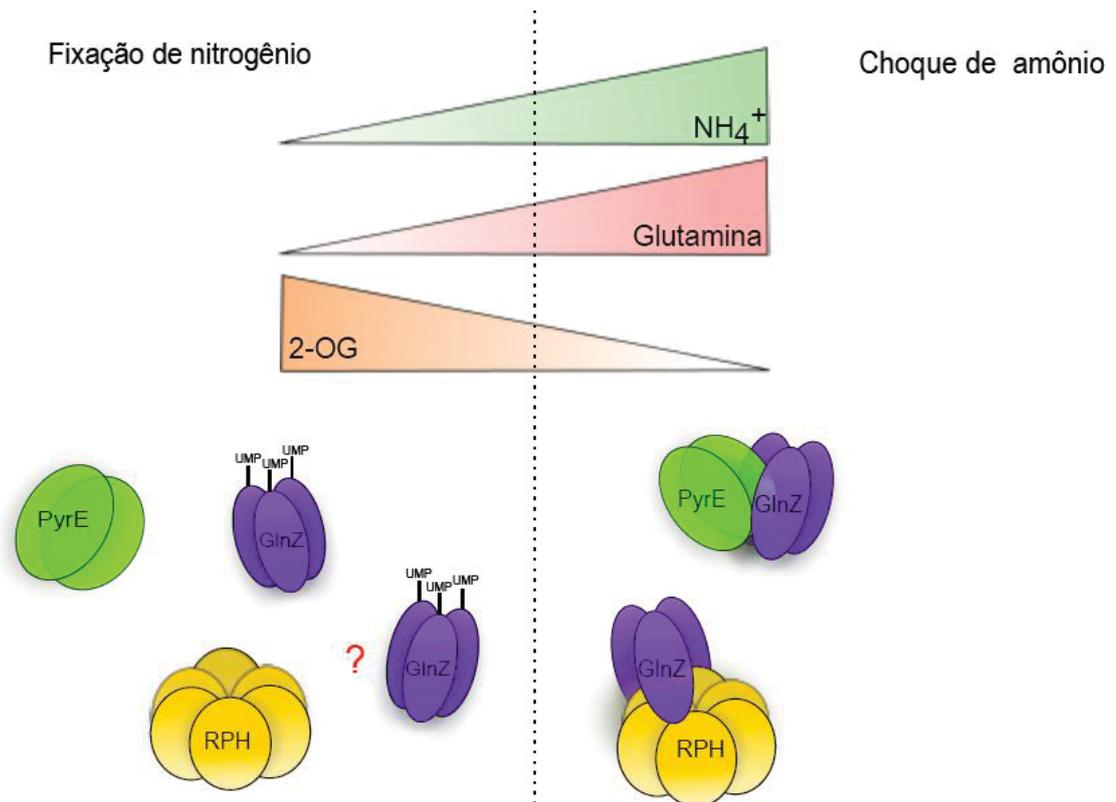


Figura 33. Modelo de regulação das proteínas PyrE e Rph pela proteína PII, GlnZ de *Azospirillum brasilense*. Duas situações fisiológicas distintas são apresentadas, uma condições de fixação de nitrogênio, quando não há nitrogênio fixado disponível, portanto os níveis de amônio e glutamina estão baixos, enquanto que de 2-OG aumenta, neste caso as proteínas PII estão uridililadas, e a condição de suficiência de nitrogênio, onde amônio e glutamina estão em alta concentração e a concentração 2-OG diminui, neste cenário, as PII não estão uridililadas. Proteína GlnZ (em azul). A proteína PyrE (em verde) ligada a GlnZ quando em choque de amônio, onde as concentrações de 2-OG são baixas, e as PII encontram-se ligadas a ADP. Na situação oposta, em que GlnZ está uridililada não ocorre a formação do complexo com PyrE. A proteína Ribonuclease PH (em amarelo) ligada a proteína GlnZ em condições de choque de amônio. A interação dessas proteínas em condições de fixação de nitrogênio ainda não é conhecida Fonte: a autora.

7. CONCLUSÃO

- As proteínas GlnZ e PyrE formam complexo *in vitro*.
- A interação de GlnZ e PyrE é favorecida na presença de ADP de forma dose dependente.
- A proteína GlnZ totalmente uridililada (GlnZ-UMP₃) não é capaz de interagir com PyrE.
- A deleção da alça-T de GlnZ impede a interação com PyrE sugerindo que a alça-T é um importante ponto de ancoragem para PyrE
- O complexo GlnZ-PyrE tem maior estabilidade em baixas concentrações de 2-OG.
- As proteínas GlnZ e Rph formam complexo *in vitro*.
- A interação de GlnZ e Rph é favorecida na presença de ADP de forma dose dependente.

8. REFERÊNCIAS

- ABD-EL-AL, A.; INGRAHAM, J. L. Control of Carbamyl Phosphate Synthesis in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 15, p. 4033–4038, 1969.
- ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 16, p. 6264–6272, 1975.
- ANDERSEN, J. T.; POULSEN, P.; JENSEN, K. F. Attenuation in the rph-pyrE operon of *Escherichia coli* and processing of the dicistronic mRNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 2, p. 381–390, 1992.
- ANDERSON, P. M.; MARVIN, S. V. Effect of ornithine, IMP, and UMP on carbamyl phosphate synthetase from *Escherichia coli*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 32, n. 6, p. 928–934, 1968.
- ANDERSON, P. M.; MEISTER, A. Evidence for an Activated Form of Carbon Dioxide in the Reaction Catalyzed by *Escherichia coli* Carbamyl Phosphate Synthetase*. **Biochemistry**, v. 4, n. 12, p. 2803–2809, 1965.
- ARAÚJO, L. M.; HUERGO, L. F.; INVITTI, A. L.; et al. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 289–294, 2008.
- ARCONDÉGUY, T.; 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.
- ARSENE, 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. 4830–4838, 1996.
- BHATIA, M. B.; VINITSKY, A.; GRUBMEYER, C. Kinetic mechanism of orotate phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*. **Biochemistry**, v. 29, n. 46, p. 10480–10487, 1990.
- BETHELL, M. R.; JONES, M. E. Molecular size and feedback-regulation characteristics of bacterial aspartate transcarbamylases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 134, n. 2, p. 352–365, 1969.
- BOURRELLIER, A. B. F.; VALOT, B.; GUILLOT, A.; et al. Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 502–507, 2010.
- 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, p. 248–254, 1976.
- BREDA, A.; ROSADO, L. A.; LORENZINI, D. M.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Molecular, kinetic and thermodynamic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 2, p. 572–586, 2012.

- BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of Glutamine Synthetase Adenylylation and Deadenylylation Is Mediated by Metabolic Transformation of the PII-Regulatory Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 12, p. 2949–2953, 1971.
- CALDOVIC, L.; TUCHMAN, M. N-Acetylglutamate and its changing role through evolution. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 2, p. 279–290, 2003.
- CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, Ecology and application of Azospirillum and other plant growth promoting bacteria (PGPB), v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009.
- CARR, P. D., CHEAH E., SUFFOLK P. M., VASUDEVAN, S. G., DIXON, N. E. & OLLIS D. L. X-ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallographi**. D52: 93–104. 1996.
- CHANGEUX, J. P.; GERHART, J. C.; SCHACHMAN, H. K. Allosteric interactions in aspartate transcarbamylase. I. Binding of specific ligands to the native enzyme and its isolated subunits. **Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 531–538, 1968.
- CHEAH, E.; CARR, P. D.; SUFFOLK, P. M.; et al. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, v. 2, n. 10, p. 981–990, 1994.
- CHELLAMUTHU, V.-R.; ERMILOVA, E.; LAPINA, T.; et al. A Widespread Glutamine-Sensing Mechanism in the Plant Kingdom. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1188–1199, 2014.
- CHEN, Y. M.; FERRAR, T. S.; LOHMEIR-VOGEL, E.; et al. The PII Signal Transduction Protein of *Arabidopsis thaliana* Forms an Arginine-regulated Complex with Plastid N-Acetyl Glutamate Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5726–5733, 2006.
- CHENG, Z.-F.; DEUTSCHER, M. P. Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6388–6393, 2003.
- CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 7, p. 2172–2175, 1989.
- COLEMAN, P. F.; SUTTLE, D. P.; STARK, G. R. Purification from hamster cells of the multifunctional protein that initiates de novo synthesis of pyrimidine nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 18, p. 6379–6385, 1977.
- COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, Cell Regulation / Edited by Werner Goebel and Stephen Lory., v. 9, n. 2, p. 167–172, 2006.
- CONDON, C. RNA Processing and Degradation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 2, p. 157–174, 2003.
- CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; et al. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB–GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1213–1218, 2007.

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

CRONAN, J. E.; WALDROP, G. L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 5, p. 407–435, 2002.

DEKHIL, B. S., CAHILL, M., STACKEBRANDT, E. SLY, L. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. largomobilis to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. parooensis to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and applied microbiology**, 1997.

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

DEUTSCHER, M. P. Degradation of Stable RNA in Bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45041–45044, 2003.

DEUTSCHER, M. P. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 659–666, 2006.

DEUTSCHER, M. P. Twenty years of bacterial RNases and RNA processing: how we've matured. **RNA**, v. 21, n. 4, p. 597–600, 2015a.

DEUTSCHER, M. P. How bacterial cells keep ribonucleases under control. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 3, p. 350–361, 2015b.

DEUTSCHER, M. P.; MARSHALL, G. T.; CUDNY, H. RNase PH: an *Escherichia coli* phosphate-dependent nuclease distinct from polynucleotide phosphorylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 13, p. 4710–4714, 1988.

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

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

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, 1992. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301767941>>. Acesso em: 22/2/2018.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, 1995.

DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. **Brock/Springer series in contemporary bioscience (USA)**, 1987. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8917814>>. Acesso em: 21/2/2018.

DONINI, S.; FERRARIS, D. M.; MIGGIANO, R.; MASSAROTTI, A.; RIZZI, M. Structural investigations on orotate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme of the de novo pyrimidine biosynthesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1180, 2017.

- DURÁN-FIGUEROA, N. V.; PIÑA-ESCOBEDO, A.; SCHROEDER, I.; SIMONS, R. W.; GARCÍA-MENA, J. Polynucleotide phosphorylase interacts with ribonuclease E through a $\beta\beta\alpha\beta\alpha$ domain. **Biochimie**, v. 88, n. 6, p. 725–735, 2006.
- EADY, R. R. Structure–Function Relationships of Alternative Nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 3013–3030, 1996.
- EBBOLE, D. J.; ZALKIN, H. Interaction of a putative repressor protein with an extended control region of the *Bacillus subtilis* pur operon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 6, p. 3553–3561, 1989.
- ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 17–26, 2001.
- FORCHHAMMER, K. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 319–333, 2004.
- FORCHHAMMER, K.; LÜDDECKE, J. Sensory properties of the PII signalling protein family. **FEBS Journal**, v. 283, n. 3, p. 425–437, 2016.
- FORCHHAMMER, K.; MARSAC, N. T. DE. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 84–91, 1994.
- FRANCIS, S. H.; ENGLEMAN, E. G. Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase: I. Studies on the uridylyl transferase and uridylyl removing enzyme(s) from *E. coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 191, n. 2, p. 590–601, 1978.
- GACA, A. O.; KAJFASZ, J. K.; MILLER, J. H.; et al. Basal Levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the Magic beyond the Stringent Response. **mBio**, v. 4, n. 5, p. e00646-13, 2013.
- GALLANT, J.; IRR, J.; CASHEL, M. The Mechanism of Amino Acid Control of Guanylate and Adenylate Biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 18, p. 5812–5816, 1971.
- GERHARDT, E. C. M.; Identificação e estudo in vitro da interação entre proteínas PII e proteínas alvo. 9 de novembro de 2015. 154f. **Tese (Doutorado)**. Ciência – Bioquímica em Universidade Federal do Paraná
- GERHARDT, E. C. M.; ARAÚJO, L. M.; RIBEIRO, R. R.; et al. Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signalling. **Microbiology**, v. 158, n. 6, p. 1656–1663, 2012.
- GERHARDT, E. C. M.; RODRIGUES, T. E.; MÜLLER-SANTOS, M.; et al. The Bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1025–1035, 2015.
- GERHART, J. C.; PARDEE, A. B. The Enzymology of Control by Feedback Inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 3, p. 891–896, 1962.
- GERHART, J. C.; SCHACHMAN, H. K. Distinct Subunits for the Regulation and Catalytic Activity of Aspartate Transcarbamylase*. **Biochemistry**, v. 4, n. 6, p. 1054–1062, 1965.

GONZÁLEZ-SEGURA, L.; WITTE, J. F.; MCCLARD, R. W.; HURLEY, T. D. Ternary Complex Formation and Induced Asymmetry in Orotate Phosphoribosyltransferase. **Biochemistry**, v. 46, n. 49, p. 14075–14086, 2007.

GOSS, T. J.; PEREZ-MATOS, A.; BENDER, R. A. Roles of glutamate synthase, gltBD, and gltF in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6607–6619, 2001.

GRUBMEYER, C.; HANSEN, M. R.; FEDOROV, A. A.; ALMO, S. C. Structure of *Salmonella typhimurium* OMP Synthase in a Complete Substrate Complex. **Biochemistry**, v. 51, n. 22, p. 4397–4405, 2012.

GRUBMEYER, C.; SEGURA, E.; DORFMAN, R. Active site lysines in orotate phosphoribosyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 27, p. 20299–20304, 1993.

HAUF, W.; SCHMID, K.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; FORCHHAMMER, K. Interaction of the Nitrogen Regulatory Protein GlnB (PII) with Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) Controls Acetyl-CoA Levels in the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

HAURYLIUK, V.; ATKINSON, G. C.; MURAKAMI, K. S.; TENSON, T.; GERDES, K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 298–309, 2015.

HEESWIJK, W. C. VAN; WESTERHOFF, H. V.; BOOGERD, F. C. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 628–695, 2013.

HEINRICH, A.; WOYDA, K.; BRAUBURGER, K.; et al. Interaction of the Membrane-bound GlnK-AmtB Complex with the Master Regulator of Nitrogen Metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34909–34917, 2006.

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

HENRIKSEN, A.; AGHAJARI, N.; JENSEN, K. F.; GAJHEDE, M. A Flexible Loop at the Dimer Interface is a Part of the Active Site of the Adjacent Monomer of *Escherichia coli* Orotate Phosphoribosyltransferase. **Biochemistry**, v. 35, n. 12, p. 3803–3809, 1996.

HESKETH, A.; FINK, D.; GUST, B.; et al. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 319–330, 2002.

HIREL, B.; BOUET, C.; KING, B.; et al. Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 5, p. 1167–1171, 1987.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041–4062, 2014.

HOVE-JENSEN, B. Phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)-less mutants of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 1487–1492, 1989.

HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 4, p. 419–435, 2015.

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

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

HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; MULLER-SANTOS, M.; et al. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012.

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of Brachiaria spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 221, p. 125–131, 2016.

ISHII, R.; NUREKI, O.; YOKOYAMA, S. Crystal Structure of the tRNA Processing Enzyme RNase PH from *Aquifex aeolicus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 32397–32404, 2003.

JARRIGE, A.-C.; BRÉCHEMIER-BAEY, D.; MATHY, N.; DUCHÉ, O.; PORTIER, C. Mutational Analysis of Polynucleotide Phosphorylase from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 321, n. 3, p. 397–409, 2002.

JIA, H.-P.; QUADRELLI, E. A. Mechanistic aspects of dinitrogen cleavage and hydrogenation to produce ammonia in catalysis and organometallic chemistry: relevance of metal hydride bonds and dihydrogen. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 2, p. 547–564, 2013.

JIANG, P.; MAYO, A. E.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49): Kinetic Characterization of Regulation by PII, PII-UMP, Glutamine, and α -Ketoglutarate. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4133–4146, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. α -Ketoglutarate Controls the Ability of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein To Regulate the Activities of NRII (NtrB) but Does Not Control the Binding of PII to NRII. **Biochemistry**, v. 48, n. 48, p. 11514–11521, 2009.

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

JONES, M. E. Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis in Animals: Genes, Enzymes, and Regulation of UMP Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 253–279, 1980.

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, n. 30, p. 17797–17807, 1995.

- KAPPOCK, T. J.; EALICK, S. E.; STUBBE, J. Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 567–572, 2000.
- KATAYANAGI, K.; MIYAGAWA, M.; MATSUSHIMA, M.; et al. Structural details of ribonuclease H from *Escherichia coli* as refined to an atomic resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 223, n. 4, p. 1029–1052, 1992.
- KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.; REMIS, J.; et al. Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1587–1594, 2004.
- KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, n. 9, p. 679–693, 1989.
- KILSTRUP, M.; HAMMER, K.; RUHDAL JENSEN, P.; MARTINUSSEN, J. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 555–590, 2005.
- KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Sequence Evolution of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees: Control Region and a Protein-Coding Region. **Evolution of Life**. p.391–413, 1991. Springer, Tokyo. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-68302-5_25>. Acesso em: 22/2/2018.
- KRIEL, A.; BITTNER, A. N.; KIM, S. H.; et al. Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, p. 231–241, 2012.
- KRUNGKRAI, S. R.; AOKI, S.; PALACPAC, N. M. Q.; et al. Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 245–255, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAPINA, T.; SELIM, K. A.; FORCHHAMMER, K.; ERMILOVA, E. The PII signaling protein from red algae represents an evolutionary link between cyanobacterial and Chloroplastida PII proteins. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 790, 2018.
- LARSSON, A.; REICHARD, P. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides X. reduction of purine ribonucleotides; allosteric behavior and substrate specificity of the enzyme system from *Escherichia coli* b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 11, p. 2540–2549, 1966.
- LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2832–2837, 2010.
- LI, Z.; DEUTSCHER, M. P. Exoribonucleases and Endoribonucleases. **EcoSal Plus**, v. 1, n. 1, 2004. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/26443351>>. Acesso em: 22/2/2018.
- LIN, S.-Y.; HAMEED, A.; LIU, Y.-C.; et al. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4601–4607, 2015.
- LIN, S.-Y.; LIU, Y.-C.; HAMEED, A.; et al. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3762–3768, 2013.

- LIN, S.-Y.; LIU, Y.-C.; HAMEED, A.; et al. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1453–1458, 2016.
- LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T.; YOUNG, L.-S.; et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1185–1190, 2012.
- LIN, S.-Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; et al. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 761–765, 2009.
- LIU, C.-P.; XU, R.; GAO, Z.-Q.; et al. Structure of orotate phosphoribosyltransferase from the caries pathogen *Streptococcus mutans*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, n. 5, p. 498–502, 2010.
- LLÁCER, J. L.; CONTRERAS, A.; FORCHHAMMER, K.; et al. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17644–17649, 2007.
- LUKOYANOV, D.; YANG, Z.; BARNEY, BRETT M.; et al. Unification of reaction pathway and kinetic scheme for N₂ reduction catalyzed by nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2012, 109.15: 5583–5587.
- MACGREGOR, C. H.; ARORA, S. K.; HAGER, P. W.; DAIL, M. B.; PHIBBS, P. V. The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* pyrE-crc-rph region and the purification of the crc gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5627–5635, 1996.
- MACKAY, B. A.; FRYZUK, M. D. Dinitrogen Coordination Chemistry: On the Biomimetic Borderlands. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 385–402, 2004.
- MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais - Academia Brasileira de Ciencias**, 1983. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302560110>>. Acesso em: 21/2/2018.
- MAHESWARAN, M.; URBANKE, C.; FORCHHAMMER, K. Complex Formation and Catalytic Activation by the PII Signaling Protein of N-Acetyl-l-glutamate Kinase from *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55202–55210, 2004.
- MAHESWARAN, M.; ZIEGLER, K.; LOCKAU, W.; HAGEMANN, M.; FORCHHAMMER, K. PII-Regulated Arginine Synthesis Controls Accumulation of Cyanophycin in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2730–2734, 2006.
- MARTÍNEZ, V. P.-M.; DEHÒ, G.; SIMONS, R. W.; GARCÍA-MENA, J. Ribonuclease PH interacts with an acidic ribonuclease E site through a basic 80-amino acid domain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 355, n. 1, p. 51–60, 2014.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 620–624, 2007a.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2805–2809, 2007b.

- MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00763/full>>. Acesso em: 22/2/2018.
- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 604–622, 1995.
- MOFFATT, B. A.; ASHIHARA, H. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism. **The Arabidopsis Book**, p. e0018, 2002.
- MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; et al. The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.
- MUSICK, W. D. L.; NYHAN, W. L. Structural Features of the Phosphoribosyl-Transferases and Their Relationship to the Human Deficiency Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1–34, 1981.
- NEUHARD, NYGAARD. Purines and Pyrimidines. In: **Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology**. NEIDHARDT, F. C. (Eds). America Society Microbiology. Washington DC, Vol.1, p.445. 1987.
- NIELSEN, F. S.; ANDERSEN, P. S.; JENSEN, K. F. The B Form of Dihydroorotate Dehydrogenase from *Lactococcus lactis* Consists of Two Different Subunits, Encoded by the pyrDb and pyrK Genes, and Contains FMN, FAD, and [FeS] Redox Centers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29359–29365, 1996.
- NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 172–179, 2000.
- NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, Cell Regulation., v. 8, n. 2, p. 168–173, 2005.
- NOMURA, Y.; IZUMI, A.; FUKUNAGA, Y.; et al. Diversity in Guanosine 3',5'-Bisdiphosphate (ppGpp) Sensitivity among Guanylate Kinases of Bacteria and Plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 22, p. 15631–15641, 2014.
- NYGAARD, P.; SMITH, J. M. Evidence for a novel glycinamide ribonucleotide transformylase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3591–3597, 1993.
- O'DONOVAN, G. A.; NEUHARD, J. Pyrimidine metabolism in microorganisms. **Bacteriological Reviews**, v. 34, n. 3, p. 278–343, 1970.
- OGAWA, T.; OKAZAKI, T. Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 193, n. 2, p. 231–237, 1984.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 900–915, 1983.
- PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1263–1271, 2006.
- POSTGATE, J. R. **The Fundamentals of Nitrogen Fixation**. CUP Archive, 1982.

- POULSEN, P.; BONEKAMP, F.; JENSEN, K. F. Structure of the *Escherichia coli* pyrE operon and control of pyrE expression by a UTP modulated intercistronic attenuation. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 8, p. 1783–1790, 1984.
- RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Control of AmtB-GlnK Complex Formation by Intracellular Levels of ATP, ADP, and 2-Oxoglutarate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 40, p. 31037–31045, 2010.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Organism Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 43–51, 1987.
- REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 155–176, 2003.
- REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* Nitrogen Regulatory Genes in the Nitrogen Response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA Complex. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 10, p. 3076–3082, 2001.
- RODRIGUES, T. E.; GERHARDT, E. C. M.; OLIVEIRA, M. A.; et al. Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 751–761, 2014.
- ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the heterotetrameric dihydroorotate dehydrogenase B of *Lactococcus lactis*, a flavoprotein enzyme system consisting of two PyrDB subunits and two iron–sulfur cluster containing PyrK subunits. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 53, n. 6, p. 802–804, 1997.
- ROWLAND, P.; NØRAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase B: Electron Transfer between Two Flavin Groups Bridged by an Iron-Sulphur Cluster. **Structure**, v. 8, n. 12, p. 1227–1238, 2000.
- RUPPEN, M. E.; SWITZER, R. L. Degradation of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 5, p. 2843–2851, 1983.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, n.2, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANT'ANNA, F. H.; TRENTINI, D. B.; WEBER, S. DE S.; et al. The PII Superfamily Revised: A Novel Group and Evolutionary Insights. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, n. 4, p. 322–336, 2009.
- SAXILD, H. H.; NYGAARD, P. The yexA gene product is required for phosphoribosylformylglycinamide synthetase activity in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 146, n. 4, p. 807–814, 2000.
- SCAPIN, G.; OZTURK, D. H.; GRUBMEYER, C.; SACCHETTINI, J. C. The Crystal Structure of the Orotate Phosphoribosyltransferase Complexed with Orotate and .alpha.-D-5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphate. **Biochemistry**, v. 34, n. 34, p. 10744–10754, 1995.

SCAPIN, G.; SACCHETTINI, J. C.; DESSEN, A.; BHATIA, M.; GRUBMEYER, C. Primary Structure and Crystallization of Orotate Phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 4, p. 1304–1308, 1993.

SHAPIRO, B. M. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, v. 8, n. 2, p. 659–670, 1969.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

SMITH, B. E. Chemistry and Biochemistry of Nitrogenase. In: F. O. Pedrosa; M. Hungria; G. Yates; W. E. Newton (Orgs.); **Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity**, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. p.11–12, 2000. Springer Netherlands. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47615-0_2>. Acesso em: 14/8/2016.

SMITH, C. S.; WELJIE, A. M.; MOORHEAD, G. B. G. Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 33, n. 2, p. 353–360, 2003.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R94–R98, 2016.

STREICHER, S. L.; SHANMUGAM, K. T.; AUSUBEL, F.; MORANDI, C.; GOLDBERG, R. B. Regulation of Nitrogen Fixation in *Klebsiella pneumoniae*: Evidence for a Role of Glutamine Synthetase as a Regulator of Nitrogenase Synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 120, n. 2, p. 815–821, 1974.

SUGIYAMA, K.; HAYAKAWA, T.; KUDO, T.; ITO, T.; YAMAYA, T. Interaction of N-Acetylglutamate Kinase with a PII-Like Protein in Rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 12, p. 1768–1778, 2004.

SULTHANA, S.; BASTUREA, G. N.; DEUTSCHER, M. P. Elucidation of pathways of ribosomal RNA degradation: an essential role for RNase E. **RNA**, v. 22, n. 8, p. 1163–1171, 2016.

SULTHANA, S.; DEUTSCHER, M. P. Multiple Exoribonucleases Catalyze Maturation of the 3' Terminus of 16S Ribosomal RNA (rRNA). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12574–12579, 2013

SULTHANA, S.; QUESADA, E.; DEUTSCHER, M. P. RNase II regulates RNase PH and is essential for cell survival during starvation and stationary phase. **RNA**, v. 23, n. 9, p. 1456–1464, 2017.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967–980, 1978.

TRUAN, D.; BJELIĆ, S.; LI, X.-D.; WINKLER, F. K. Structure and Thermodynamics of Effector Molecule Binding to the Nitrogen Signal Transduction PII Protein GlnZ from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 15, p. 2783–2799, 2014.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; et al. A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531–539, 2010.

TURNBOUGH, C. L.; SWITZER, R. L. Oxygen-dependent inactivation of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in stationary-phase cultures of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 121, n. 1, p. 108–114, 1975.

TYAGI, S.; SINGH, D. K. *Azospirillum himalayense* sp. nov., a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 259–266, 2014.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

WANG, G. P.; HANSEN, M. R.; GRUBMEYER, C. Loop Residues and Catalysis in OMP Synthase. **Biochemistry**, v. 51, n. 22, p. 4406–4415, 2012.

WIRÉN, N. VON; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. **Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport**, Topics in Current Genetics. p.95–120, 2004. Springer, Berlin, Heidelberg. Disponível em: <<https://link.springer.com/chapter/10.1007/b95775>>. Acesso em: 22/2/2018.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; et al. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002430, 2011.

WITTE, J. F.; TSOU, R.; MCCLARD, R. W. Cloning, Overproduction, and Purification of Native and Mutant Recombinant Yeast Orotate Phosphoribosyltransferase and the Demonstration from Magnetization Inversion Transfer That a Proposed Oxocarbenium Intermediate Does Not Have a Kinetic Lifetime. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 361, n. 1, p. 106–112, 1999.

WONG, J. Y.; BERNLOHR, D. A.; TURNBOUGH, C. L.; SWITZER, R. L. Purification and properties of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 20, n. 20, p. 5669–5674, 1981.

XIE, C.-H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1435–1438, 2005.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; et al. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition1. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, n. 1, p. 149–165, 1998.

YAN, D.; LENZ, P.; HWA, T. Overcoming Fluctuation and Leakage Problems in the Quantification of Intracellular 2-Oxoglutarate Levels in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6763–6771, 2011.

YATES, R. A.; PARDEE, A. B. Pyrimidine Biosynthesis in *Escherichia Coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 221, n. 2, p. 743–756, 1956.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. Springer Science & Business Media, 1992.

- YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 959–963, 2008.
- YUAN, J.; DOUCETTE, C. D.; FOWLER, W. U.; et al. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 1, p. 302, 2009.
- ZAMAROCZY, M. DE; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 224, n. 3, p. 421–430, 1990.
- ZAMAROCZY, M. DE; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2507–2515, 1993.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; SERATE, J.; CONRAD, M. C.; ROBERTS, G. P. Mutagenesis and Functional Characterization of the Four Domains of GlnD, a Bifunctional Nitrogen Sensor Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 11, p. 2711–2721, 2010.
- ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; et al. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2618–2624, 2013.
- ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X.; XU, L.; LAI, R. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–7, 2009.
- ZUO, Y.; DEUTSCHER, M. P. The Physiological Role of RNase T Can Be Explained by Its Unusual Substrate Specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29654–29661, 2002.