

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREY WESLEY DE SOUZA

ANÁLISE FUNCIONAL E REGULATÓRIA DA ENZIMA MÁLICA MAEB2 DE
Azospirillum brasilense

CURITIBA

2020

ANDREY WESLEY DE SOUZA

ANÁLISE FUNCIONAL E REGULATÓRIA DA ENZIMA MÁLICA MAEB2 DE
Azospirillum brasilense

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
(Bioquímica), no Programa de Pós-Graduação em
Ciências, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

Co-orientadora: Dr^a. Edileusa C. Marques Gerhardt

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Souza, Andrey Wesley de
Análise funcional e regulatória da enzima málica MaeB2 de
Azospirillum brasilense. / Andrey Wesley de Souza. – Curitiba, 2020.
49 p.: il.

Orientador: Luciano Fernandes Huergo.
Coorientadora: Edileusa C. Marques Gerhardt.

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

1. *Azospirillum brasilense*. 2. Enzimas - Análise. 3. Enzimas -
Regulação. I. Título II. Huergo, Luciano Fernandes, 1978-. III. Gerhardt,
Edileusa Cristina Marques, 1985-. IV. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

CDD (22. ed.) 579.323



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

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 **ANDREY WESLEY DE SOUZA** intitulada: **ANÁLISE FUNCIONAL E REGULATÓRIA DA ENZIMA MÁLICA MAEB2 DE *Azospirillum brasilense***, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO FERNANDES HUERGO, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 30 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

30/11/2020 20:45:34.0

LUCIANO FERNANDES HUERGO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/11/2020 20:17:55.0

ROSE ADELE MONTEIRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/11/2020 21:40:46.0

VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 64180

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 64180

RESUMO

As enzimas málicas catalisam a decarboxilação oxidativa do malato a piruvato com a redução associada de NAD^+ ou NADP^+ . Em eucariotos, enzimas málicas citoplasmáticas, mitocondriais e plastidiais já foram caracterizadas e apresentam estrutura conservada. Por outro lado, as enzimas málicas procarióticas, que são mais diversas em estrutura, são bem menos caracterizadas. As enzimas málicas tipo MaeB são encontradas em bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Sinorhizobium meliloti* e *Azospirillum brasilense* e possuem uma estrutura multimodular composta por dois domínios característicos, um N-terminal, responsável pela atividade málica, e outro C-terminal com homologia as fosfotransacetilases (PTA), cuja função não é bem esclarecida. Em *A. brasilense*, são encontradas duas isoformas de proteínas tipo MaeB, uma NADP^+ -dependente (AbMaeB1), já caracterizada cineticamente, e outra, como demonstrado pelos resultados aqui descritos, NAD^+ -dependente (AbMaeB2). Estudos anteriores demonstraram que as enzimas tipo MaeB participam de processos metabólicos essenciais, tendo um papel central controlando o destino de carbono no nó metabólico fosfoenolpiruvato / piruvato / oxaloacetato graças a capacidade de responderem aos níveis de diferentes metabólitos. Nesse sentido, no presente trabalho, a enzima málica AbMaeB2 foi purificada e caracterizada a fim de esclarecer o possível papel desta enzima no metabolismo de *A. brasilense*. Análises de gel-filtração sugerem uma massa molecular aproximada de 696 kDa para AbMaeB2, sendo a massa teórica do monômero estimada em 83 kDa, o que sugere que essa enzima corresponde a um octâmero de alto peso molecular, assim como observado para a proteína MaeB de *E. coli* (EcMaeB). Os resultados dos ensaios sobre os efeitos de diferentes metais na atividade málica de AbMaeB2 indicam que ambos os metais, Mg^{2+} e Mn^{2+} , podem ser utilizados como co-fatores por esta enzima, com preferência por Mn^{2+} , o que está de acordo os resultados obtidos em estudos anteriores para a MaeB de *E. coli* e MaeB1 de *A. brasilense*. Além disso, a ativação por KCl, anteriormente relatada para EcMaeB e AbMaeB1, também foi observada para AbMaeB2. Através dos ensaios realizados para a determinação dos parâmetros cinéticos, os valores de K_M para os substratos da enzima AbMaeB2 foram estimados em 25,4 mM e 21,9 mM para L-malato na presença de NAD^+ e NADP^+ saturantes, respectivamente, e 0,8 mM para NAD^+ e 1,1 mM para NADP^+ em concentrações saturantes de L-malato. Por fim, dados preliminares sobre o efeito de diferentes metabólitos na atividade málica de AbMaeB2 indicam uma possível regulação desta enzima por acetil-fosfato, ATP e ADP.

Palavras-chave: enzima málica, *Azospirillum brasilense*, regulação do metabolismo, MaeB

ABSTRACT

Malic enzymes catalyze the oxidative carboxylation of malate to pyruvate with the associated reduction of NAD^+ or NADP^+ . In eukaryotes, cytoplasmatic, mitochondrial and plastidial malic enzymes have already been characterized and have a conserved structure. On the other hand, prokaryotic malic enzymes, which are more diverse in structure, are much less characterized. Malic enzymes MaeB-like are found in gram-negative bacteria like *Escherichia coli*, *Sinorhizobium meliloti* and *Azospirillum brasilense* and have a multimodular structure composed of two characteristic domains, a N-terminal domain, responsible for malic activity, and another C-terminal domain with homology to phosphotransacetylases (PTA), whose function is not well understood. In *A. brasilense*, two isoforms of MaeB-like proteins are found, the NADP^+ -dependent (AbMaeB1), already characterized kinetically, and another, as shown by the results described here, NAD^+ -dependent (AbMaeB2). Previous studies have shown that MaeB-like enzymes participate in essential metabolic processes, playing a central role in controlling the fate of carbon in the phosphoenolpyruvate / pyruvate / oxaloacetate metabolic node due to the ability to respond to the levels of different metabolites. In this sense, in the present work, the malic enzyme AbMaeB2 was purified and characterized in order to clarify the possible role of this enzyme in the metabolism of *A. brasilense*. Gel-filtration chromatography analyses suggest a molecular mass of 696 kDa for AbMaeB2. The predicted molecular weight of the MaeB2 polypeptide is 83 kDa, hence, MaeB2 is also likely to be arranged in a high molecular weight oligomer as observed in *E. coli* and *S. meliloti*, likely forming an octamer. The results of tests of metals on the malic activity indicate that Mg^{2+} and Mn^{2+} are essential to the malic activity of AbMaeB2, with a preference for Mn^{2+} , in agreement with the results obtained with *E. coli* MaeB and *A. brasilense* MaeB1. In addition, KCl activation, previously reported for EcMaeB and AbMaeB1, has also been observed for AbMaeB2. The K_M values for the substrates of the AbMaeB2 enzyme were estimated to be 25,4 mM and 21,9 mM for L-malate in the presence of saturating NAD^+ and NADP^+ , respectively, and 0,8 mM for NAD^+ and 1,1 mM for NADP^+ in saturating concentrations of L-malate. Finally, preliminary data on the effect of different metabolites on the AbMaeB2 malic activity indicate a possible regulation of this enzyme by acetyl-phosphate, ATP and ADP.

Keywords: malic enzyme, *Azospirillum brasilense*, metabolism regulation, MaeB.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação do nó metabólico fosfoenolpiruvato (PEP) / piruvato / oxaloacetato (OAA).....	16
FIGURA 2: Domínio das enzimas málicas SfcA e MaeB de Escherichia coli	20
FIGURA 3: Perfil eletroforético da purificação de AbMaeB2His	30
FIGURA 4: Análise da eluição de AbMaeB2 em cromatografia de gel-filtração.....	31
FIGURA 5: Atividade de AbMaeB2 na presença de NAD ⁺ e NADP ⁺	33
FIGURA 6: Efeito dos íons divalentes Mg ²⁺ e Mn ²⁺ na atividade málica da enzima MaeB2 de A. brasilense	34
FIGURA 7: Determinação dos parâmetros cinéticos de AbMaeB2.....	37
FIGURA 8: Propriedades regulatórias de AbMaeB2	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	24
TABELA 2: COMPARAÇÃO DOS VALORES CINÉTICOS DE KM ESTIMADOS PARA AS ENZIMAS TIPO MAEB DE BACTÁRIAS GRAM-NEGATIVAS	38

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-oxoglutarato
AbMaeB1	Enzima málica NADP ⁺ -dependente de <i>A. brasilense</i>
AbMaeB2	Enzima málica NAD ⁺ -dependente de <i>A. brasilense</i>
ADP	5' difosfato de adenosina
ATP	5' trifosfato de adenosina
BSA	Albumina bovina
DO600	Densidade óptica a 600 nm
EcMaeB	Enzima málica NADP ⁺ -dependente de <i>E. coli</i>
GlnZ	Proteína GlnZ
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobases
Kmr	Resistência a canamicina
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida oxidado
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida reduzido
NADP ⁺	Fosfato dinucleotídeo de nicotinamida oxidado
NADPH	Fosfato dinucleotídeo de nicotinamida reduzido
OAA	Oxaloacetato
PCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato inorgânico
PTA	Fosfoacetilase
Rrpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em géis de poliacrilamida
TME	Trifosforidina dependente de nucleotídeo
DME	Difosforidina dependente de nucleotídeos
UV	Ultravioleta
V/V	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Azospirillum brasilense	15
2.2	ENZIMAS MÁLICAS	16
2.3	ENZIMAS MÁLICAS EUCARIÓTICAS	18
2.4	ENZIMAS MÁLICAS PROCARIÓTICAS	18
2.5	ENZIMAS MÁLICAS TIPO MaeB E O DOMÍNIO PTA.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	24
4.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO	24
4.3	ANTIBIÓTICOS	25
4.4	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	25
4.5	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	25
4.6	ELETROFORESE DE DNA.....	26
4.7	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MaeB2 DE <i>A. brasilense</i>	26
4.8	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA MaeB2 DE <i>A. brasilense</i>	26
4.9	CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRAÇÃO.....	26
4.10	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	27
4.11	ELETROFORESE DESNATURANTE DE PROTEÍNAS	27
4.12	ENSAIOS DE LC-MS	27
4.13	ATIVIDADE MÁLICA DE AbMaeB2 <i>IN VITRO</i>	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	PURIFICAÇÃO DE AbMaeB2.....	30
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

As enzimas málicas são responsáveis pela decarboxilação oxidativa reversível do malato a piruvato e CO_2 , com a redução associada de NAD^+ ou NADP^+ (MITSCH et al., 1998; BOLOGNA et al., 2007). Essas enzimas são classificadas de acordo com sua especificidade de ligação a coenzima, podendo então ser divididas em NAD^+ -dependentes (EC 1.1.1.39) e NADP^+ -dependentes (EC 1.1.1.40).

Os substratos e produtos das enzimas málicas apresentam uma extensa participação em diferentes vias metabólicas, o que justifica a sua ampla distribuição dentro dos domínios da vida. Em eucariotos as enzimas málicas apresentam diferentes isoformas, sendo encontradas no citosol, nas mitocôndrias e nos plastídios. Nesses organismos, a enzima málica citosólica está associada, principalmente, a reações de síntese de ácidos graxos e esteroides através do fornecimento de NADPH para a enzima ácido graxo sintase (GOODRIDGE et al., 1996). Em animais, a enzima málica mitocondrial fornece NADPH para o metabolismo de neurônios e tecidos tumorais (MURAI et al., 2017) e em fungos, como em *Cunninghamella bainieri* e *Mortierella alpina*, está associada com a produção e acúmulo de lipídios (HAO et al., 2014; HAULB et al., 2018). Já em plantas, essas enzimas estão, principalmente, envolvidas na fixação do carbono, na biossíntese de aminoácidos e lipídios e na reposição dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (TROCONI et al., 2008; SWEETLOVE et al., 2010).

Na maioria dos procariotos são encontradas tanto enzimas málicas NAD^+ -dependentes quanto NADP^+ -dependentes. A primeira promove a entrada de carbono derivado de aminoácidos ou C4 dicarboxilatos na gliconeogênese. A segunda fornece o poder redutor para síntese de vários componentes celulares (GOURDON et al., 2000; FUKUDA et al., 2005). Em *Escherichia coli*, por exemplo, duas enzimas málicas já foram caracterizadas, ScfA e MaeB. ScfA (ou MaeA) é um tetrâmero que liga tanto NAD^+ quanto NADP^+ , enquanto MaeB é, provavelmente, um octâmero NADP^+ -dependente (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007). Em *Sinorhizobium meliloti*, duas enzimas málicas tipo MaeB foram identificadas. Ambas são octâmeros sendo uma delas NAD^+ -dependente (denominada DME - difosforidina dependente de nucleotídeos) e outra NADP^+ -dependente (denominada TME – trifosforidina dependente de nucleotídeo) (VOEGEL; MITSCH; FINAN, 1999). Já em *Azospirillum brasilense* Sp245, além da proteína MaeB1 NAD^+ -dependente (AbMaeB1), que compartilha 47% de identidade com

a MaeB de *E. coli*, foi verificada, por análise de sequência, a presença de uma outra proteína com sequência 58% idêntica à MaeB de *E. coli* (EcMaeB). Codificada por um gene que está no plasmídeo p1, essa proteína foi denominada de MaeB2 (AbMaeB2) (ARAÚJO, 2018) e ainda não foi caracterizada.

As enzima tipo MaeB de *E. coli* (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007), *S. meliloti* (VOEGELE; MITSCH; FINAN, 1999) e *A. brasilense* (HUERGO et al., 2020) possuem um domínio carboxil terminal, de aproximadamente 320 aminoácidos, com homologia às fosfotransacetilases (PTA). Por se tratar de um domínio grande e levando em consideração que está presente em várias bactérias gram-negativas, acredita-se que o domínio PTA deva ter alguma relevância funcional.

As fosfotransacetilases tem um papel central no chamado “*overflow metabolism*”, no qual parte da glicose disponível no meio é utilizada para produzir acetato: a PTA converte acetil-CoA e fosfato inorgânico a acetil-fosfato e ATP e a acetato quinase (Ack) converte acetil-fosfato e ADP em acetato e ATP. Na ausência de glicose, a bactéria utiliza o acetato disponível para iniciar o processo reverso, denominado “*acetato switch*”, e produzir mais energia (WOLFE, 2005; CAMPOS-BERMUDEZ et al., 2010). Araújo (2018) identificou através de análises por LC-MS a atividade PTA das enzimas MaeB de *A. brasilense* (AbMaeB1) e *E. coli* (EcMaeB), mostrando que essas enzimas são capazes de produzir acetil-CoA quando incubadas com Acetil-fosfato e Coenzima A, o que contrasta com os resultados obtidos por Bologna, Andreo e Drincovich (2007) que não reportaram atividade PTA em seus ensaios. Isso indica que essas enzimas podem desempenhar um papel muito mais amplo no metabolismo dessas bactérias, atuando não somente como um componente chave no nó metabólico fosfoenolpiruvato (PEP) / piruvato / oxaloacetato (OAA) e na relação NAD(P)H/NAD(P)⁺, mas também exercendo uma função central no metabolismo do acetato.

Além do possível papel de fosfotransacetilase da porção C-terminal das enzimas tipo MaeB, existe a possibilidade desse domínio estar envolvido na regulação da atividade málica dessas enzimas através da ligação de efetores como acetil-CoA, glutamato, aspartato e glucose-6-fosfato (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007; ZHANG et al., 2016; ARAÚJO, 2018). Em *S. meliloti* a porção PTA é cataliticamente inativa, sendo essencial para a oligomerização de MaeB mas não para a atividade málica dessa enzima, o que sugere que esse domínio pode estar envolvido no controle metabólico de MaeB (HUERGO et al., 2020), uma vez que não está claro como essas enzimas respondem a tantos metabólitos diferentes. De fato, ambas as isoformas de MaeB de *S.*

meliloti (DME e TME) estão sujeitas a regulação por uma série de metabólitos (MITSCH et al., 1998). Além disso, Huergo e colaboradores (2020) mostraram que a enzima MaeB de *E. coli* é inibida na presença de acetil-CoA, assim como ocorre com AbMaeB1, sendo o efeito inibitório, nessa última, revertido pela adição de coenzima A. Esses dados apontam para o importante papel das enzimas tipo MaeB no metabolismo de procariotos, contribuindo para o controle da distribuição do fluxo de carbono entre o anabolismo, o catabolismo e o suprimento de energia com base no sensoramento de metabólitos.

Outra função importante das enzimas málicas em procariotos é o seu provável papel na fixação do nitrogênio. Driscoll e Finan (1993) construíram mutantes de *S. meliloti* deficientes na síntese da enzima málica NAD⁺-dependente, estes mutantes desenvolveram nódulos quando inoculados com alfafa, porém, não apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio. Além disso, Mitsch e colaboradores (2007) verificaram que a enzima MaeB DME de *S. meliloti* é essencial para a fixação simbiótica do nitrogênio nesse organismo.

Bactérias do gênero *Azospirillum* são organismos diazotróficos que se associam às raízes de diversas plantas de interesse agrícola e ecológico promovendo o crescimento vegetal (PGPB) e aumentando a produtividade (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER, 1991; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Dentre todas as espécies já descritas do gênero, *A. brasilense* é a mais bem estudada (ALMEIDA, 2016), sobretudo em relação a fixação biológica do nitrogênio que é um processo altamente custoso para as células. Sendo assim, vias metabólicas relacionadas a fixação e ao metabolismo de nitrogênio são finamente reguladas, tanto a nível transcricional quanto pós-traducional (POSTGATE, 1982). Uma vez que está claro o importante papel da proteína MaeB no nó metabólico PEP / piruvato / OAA, e que existem evidências do envolvimento das enzimas málicas no metabolismo do nitrogênio, fica evidente a importância da caracterização do papel funcional dessas enzimas para a coordenação de processos metabólicos centrais de *E. coli* e *A. brasilense*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense é a espécie mais estudada entre as vinte e três já descritas do gênero *Azospirillum* (ALMEIDA, 2016). Bactérias desse gênero são de vida livre e pertencentes a divisão das α -Proteobactérias (YOUNG, 1992), sendo ainda microaeróbicas, gram-negativas, curvas e móveis (ECKERT et al., 2001). São organismos diazotróficos capazes de associarem-se com as raízes de diversas plantas de interesse agrícola (DOBEREINER e DAY, 1976; DOBEREINER, 1991; ECKERT et al., 2001) e de importância ecológica (BASHAN e DE-BASHAN, 2010, DOBBELAERE et al., 2001). Apresentam assim um grande potencial de uso como biofertilizantes graças a sua eficiência na fixação de nitrogênio e no seu potencial de promover o crescimento vegetal (bactérias promotoras do crescimento vegetal – PGPB). Isso se deve a produção de fitormônios, como auxinas (PRINSEN et al., 1993), citocininas (TIEN et al., 1979), etieno (STRZELCZYK et al., 1994), e giberilinas (BOTTINI et al., 1989) por essas bactérias, além de outros reguladores de crescimento envolvidos no aumento da capacidade de assimilação de nutrientes pela planta em decorrência da promoção do crescimento da raiz (DOBBELAERE et al., 2001).

São vários os estudos que apontam o uso de *Azospirillum* como um promissor inoculante por apresentarem importantes mudanças fisiológicas e morfológicas nas plantas inoculadas com estes microrganismos. Estudos como o de Hungria (2011), mostram um aumento médio de 24% a 30% no rendimento de grãos de milho inoculados com *A. brasilense* e de 13 a 18% para trigo. Em *Setaria viridis*, *A. brasilense* HM053, uma cepa que excreta amônio, permitiu o crescimento em meio livre de nitrogênio e promoveu o crescimento do trigo tanto em condições laboratoriais como em campo (PANKIEVICZ et al., 2015). Tudo indica que este aumento no rendimento graças a associação com *Azospirillum* ocorra devido a múltiplos mecanismos que atuam conjuntamente (BASHAN; HOLGUIN. LUZ, 2004).

O nitrogênio é um elemento fundamental para a manutenção da vida no planeta por ser necessário para a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e outras biomoléculas. Sendo o gás nitrogênio (N_2) um componente que constitui 80% da atmosfera da Terra, o processo de transformação do N_2 em NH_3 (forma utilizável metabolicamente) pelas bactérias diazotróficas constitui uma importante via através da qual o nitrogênio

atmosférico pode ser utilizado para a síntese de biomoléculas que contenham nitrogênio (ZHANG et al., 1997). O fato é que a fixação biológica do nitrogênio é um processo altamente custoso para as células, representando um gasto de 16 moléculas de ATP por molécula de N_2 fixada. Com isso, vias metabólicas relacionadas a fixação e ao metabolismo de nitrogênio são finamente reguladas, tanto a nível transcricional quanto pós-traducional (POSTGATE, 1982). As enzimas málicas do tipo MaeB podem ser uma peça chave na regulação e coordenação das vias relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, uma vez que estudos anteriores mostraram que essas enzimas são essenciais para a fixação deste elemento em *S. meliloti* (MITSCH et al., 2007).

2.2 ENZIMAS MÁLICAS

A descarboxilação oxidativa reversível do malato a piruvato e CO_2 , com a redução associada de NAD^+ ou $NADP^+$, é catalisada pelas enzimas málicas (ME) (MITSCH et al., 1998; BOLOGNA et al., 2007). Essas enzimas estão amplamente distribuídas nos organismos das principais divisões biológicas, onde realizam a coordenação de processos metabólicos centrais e contribuem para o controle da distribuição do fluxo de carbono entre o anabolismo, o catabolismo e o suprimento de energia, atuando como um componente chave no nó metabólico fosfoenolpiruvato (PEP) / piruvato / oxaloacetato (OAA) e na relação $NAD(P)H/NAD(P)$ (Figura 1).

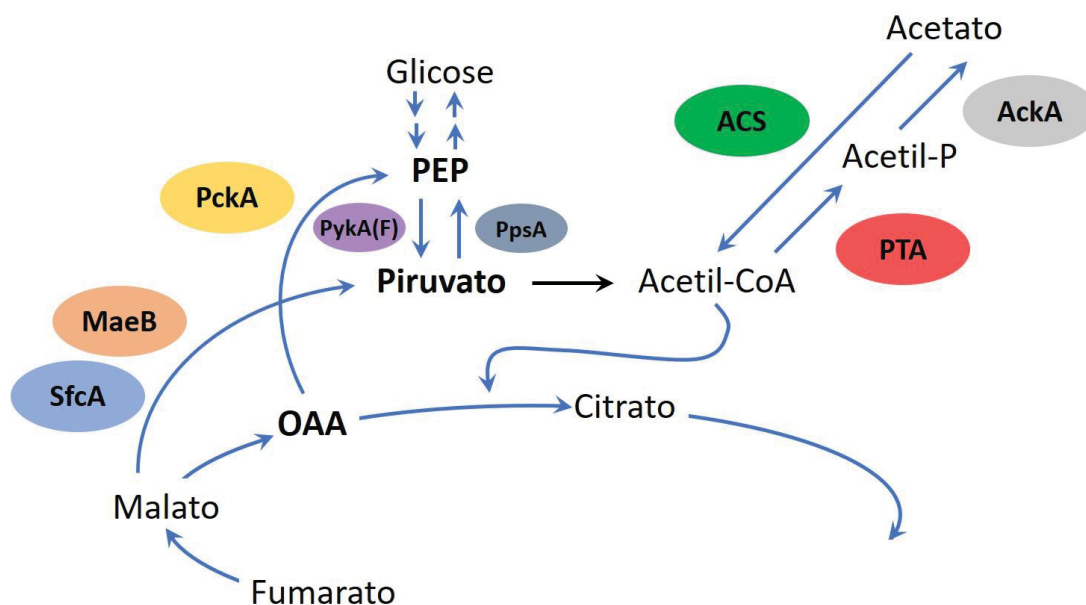


FIGURA 1: Representação do nó metabólico fosfoenolpiruvato (PEP) / piruvato / oxaloacetato (OAA). Juntamente com a enzima PEP sintase (PpsA), as enzimas málicas formam PEP, o precursor direto da gliconeogênese, e contribuem para o controle da distribuição do fluxo de carbono entre o anabolismo, o catabolismo e o suprimento de energia. Adaptado de BOLOGNA; ANDREO e DRINCOVICH, 2007.

As enzimas málicas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade de ligação a coenzima, podendo então ser divididas em NAD^+ -dependentes (EC 1.1.1.39) e NAD(P)^+ -dependentes (EC 1.1.1.40). Em procariotos essa classificação também leva em consideração a habilidade dessas enzimas de decarboxilar oxaloacetato (OAA) (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007).

Em eucariotos, as enzimas málicas apresentam diferentes isoformas, sendo encontradas no citosol, nas mitocôndrias e nos plastídios. O genoma de vertebrados codifica um conjunto uniforme de três enzimas málicas: uma NADP^+ -dependente citosólica (cNADP-ME) e duas mitocondriais, uma NAD^+ -dependente (mNAD-ME, EC 1.1.1.28) e outra NADP^+ -dependente (mNADP-ME, EC 1.1.1.40) (TROCONI, et al., 2018). As isoformas cNADP-ME e mNADP-ME estão associadas, principalmente, com a produção de NADPH no fígado e tecido adiposo para as reações de síntese de cadeias longas de ácidos graxos e esteroides pela enzima ácido graxo sintase (LOEBER e DWORKIN, 1994), com a secreção de insulina nas células beta-pancreáticas (HASAN et al., 2015) e no fornecimento de NADPH para o metabolismo de neurônios e tecidos tumorais (MURAI et al., 2017). Já a enzima mNAD-ME é expressa apenas em tecidos neoplásicos de rápido crescimento e está envolvida no metabolismo energético (MOREADITH e LEHNINGER, 1984). Em fungos, como em *Cunninghamella bainieri* e *Mortierella alpina*, a isoforma mitocondrial NADP^+ -dependente está associada com a produção e acúmulo de lipídios (HAO et al., 2014). Já em plantas, dependendo da espécie, as enzimas málicas apresentam várias isoformas distribuídas entre o citosol (cNADP-ME, 1.1.1.40), plastídeos (pINADP-ME, EC 1.1.1.40) e mitocôndrias (mNAD-ME, EC 1.1.1.39). Nesses organismos essas enzimas estão, principalmente, envolvidas em respostas de defesa (ALAVAREZ et al., 2013), biossíntese de lignina (SCHAAF et al., 1995), controle do pH citosólico (MARTINOIA e RENTSCH, 1994), regulação do fechamento de estômatos (LAPORTE et al., 2002), fotossíntese de plantas com metabolismo CAM (CUSHMAN, 1992) e C4 (DRINCOVICH et al., 2010; SAIGO et al., 2013), fixação do carbono, biossíntese de aminoácidos e lipídios e na reposição dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (TROCONI et al., 2008; SWEETLOVE et al., 2010).

Nos procariotos são encontradas enzimas málicas NAD^+ -dependentes e NADP^+ -dependentes. Essas enzimas fazem parte do nó metabólico PEP / piruvato / OAA, que liga a glicólise e a gliconeogênese ao ciclo dos ácidos tricarbóxílicos (SAUER e EIKEMANNS, 2005). As NAD^+ -dependentes promovem a entrada de carbono derivado

de aminoácidos ou C4 dicarboxilatos na gliconeogênese, enquanto as NADP⁺-dependentes fornecem o poder redutor para síntese de vários componentes e intermediários celulares (GOURDON et al., 2000; FUKUDA et al., 2005). Esses organismos podem ainda codificar múltiplas enzimas málicas, com diferentes propriedades catalíticas e reguladoras (SPAANS et al., 2015).

2.3 ENZIMAS MÁLICAS EUCARIÓTICAS

As enzimas málicas eucarióticas são, em sua maioria, homotetraméricas, com subunidades de 62-68 kDa, apesar de já terem sido observados heterômeros de duas subunidades diferentes: subunidade alfa (~60 kDa, ou mNAD-ME1) e beta (~58 kDa, ou mNAD-ME2) e homodímeros ativos α_2 e β_2 nas isoformas mNAD⁺-dependentes de plantas (TROCONI et al., 2008, 2010) e estrutura dimérica em algumas plantas e em *Trypanosoma cruzi* (IGLESIAS; ANDREO, 1990). Ainda, no fígado de pombos, dependendo do pH, as enzimas originalmente tetraméricas podem formar vários estados oligoméricos (IGLESIAS; ANDREO, 1990; WEDDING; CANELLAS; BLACK, 1981).

Embora as estruturas terciárias gerais das enzimas málicas eucarióticas sejam quase idênticas, as conformações dessas enzimas variam consideravelmente de acordo com a ligação de diferentes ligantes (HSIEH et al., 2019), incluindo cátions, inibidores análogos ao substrato, cofatores (NAD⁺ e NADP⁺), o ativador fumarato – em mamíferos e plantas – e o inibidor ATP – em mamíferos, peixes e *Trichomonas vaginalis* (XU, et al., 1999; YANG, 2000; YANG et al., 2002; CHANG e TONG, 2003; TAO et al., 2003). Vale ressaltar que existem variações quanto a regulação dessas enzimas, não havendo um modelo universal.

A estrutura quaternária das enzimas málicas eucarióticas possui quatro domínios (XU et al., 1999) e podem apresentar forma aberta, com sítio ativo exposto à superfície da proteína, ou forma fechada, protegendo a sítio ativo do solvente. A conformação fechada é, provavelmente, a conformação cataliticamente ativa, enquanto a conformação aberta parece ser necessária para a ligação do substrato e liberação do produto, sendo possível a ocorrência de interconversões entre as conformações aberta e fechada durante a catálise (HSIEH et al., 2019).

2.4 ENZIMAS MÁLICAS PROCARIÓTICAS

Na maioria dos procariotos são encontradas tanto enzimas málicas NAD^+ -dependentes quanto NADP^+ -dependentes, que apresentam diferentes funções nestes organismos. Em *E. coli*, por exemplo, foram identificados dois genes que codificam para enzimas málicas, uma NAD(P)^+ -dependente (SfcA) e uma NADP^+ -dependente (MaeB). SfcA (ou MaeA) é um tetrâmero com subunidades de 64 kDa que liga tanto NAD^+ quanto NADP^+ , enquanto MaeB é, provavelmente, um octâmero com massa de 83 kDa por monômero NADP^+ -dependente (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007). Em *S. meliloti*, duas enzimas málicas tipo MaeB foram identificadas. Ambas formam octâmeros com estrutura quimérica similar à MaeB de *E. coli*, sendo uma delas NAD(P)^+ -dependente (denominada DME - difosforidina dependente de nucleotídeos) e outra NADP^+ -dependente (denominada TME – trifosforidina dependente de nucleotídeo) (VOEGELE; MITSCH; FINAN, 1999). Já em *A. brasilense* Sp245, além da proteína MaeB1 NADP^+ -dependente, um octâmero com monômeros de 83 kDa, que compartilha 47% de identidade com a MaeB de *E. coli*, foi verificada, por análise de sequência, a presença de uma outra proteína com sequência 58% idêntica à MaeB de *E. coli*. Codificada por um gene que está no plasmídeo p1, essa proteína foi denominada de MaeB2 (AbMaeB2) (ARAÚJO, 2018) e ainda não foi caracterizada.

As enzimas málicas procarióticas apresentam três domínios conservados, sendo dois deles específicos para a atividade málica: domínio N-terminal e o domínio de ligação de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, e um terceiro domínio extra carboxil terminal, de aproximadamente 320 aminoácidos e com homologia às fosfotransacetilases (PTA), encontrado exclusivamente nas enzimas málicas tipo MaeB de algumas bactérias gram-negativas como *E. coli* (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007), *S. meliloti* (VOEGELE; MITSCH; FINAN, 1999; MITSCH; COWIE; FINAN, 2007), e *A. brasilense* (HUERGO et al., 2020) (Figura 2).

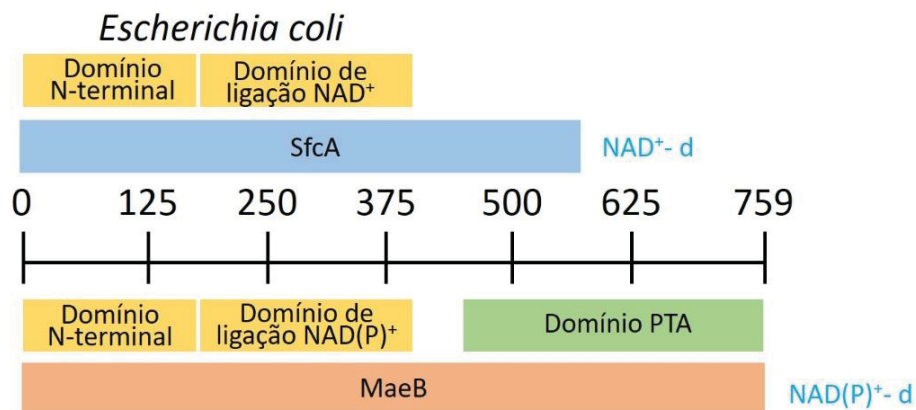


FIGURA 2: Domínio das enzimas málicas SfcA e MaeB de *Escherichia coli*. O domínio N-terminal e o domínio de ligação de NAD⁺/NADP⁺ são conservados na maioria das enzimas málicas. O domínio extra carboxil terminal (domínio PTA) é encontrado exclusivamente nas enzimas málicas tipo MaeB de algumas bactérias gram-negativas, como *E. coli*, *S. meliloti* e *A. brasilense*. Adaptado de BOLOGNA; ANDREO e DRINCOVICH, 2007.

Muitas enzimas málicas procarióticas requerem um cátion divalente para sua atividade (Mg²⁺ ou Mn²⁺) (CHANG e TONG, 2003) e apresentam controle alostérico por metabólitos chaves. A atividade málica da enzima MaeB de *E. coli* é inibida por acetil-CoA, oxaloacetato e fumarato, e ativada pelos aminoácidos glutamato e aspartato, glucose-6-fosfato e acetil-fosfato; enquanto SfcA é ativada apenas por aspartato e inibida por acetil-fosfato, coenzima A, OAA e palmitoil-CoA (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007). O mesmo se aplica as enzimas málicas tipo MaeB de *S. meliloti*, que também apresentam regulação por diversos metabólitos (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007; VOEGELE et al., 1999).

A regulação por derivados de acetato em ambas as enzimas málicas de *E. coli*, observada por Bologna, Andreo e Drincovich (2007), chama a atenção sobretudo no caso do acetil-fosfato, que parece ser um sinalizador global nessas bactérias. Em determinadas condições fisiológicas, altas concentrações de acetil-fosfato fazem com que a isoforma NADP⁺-dependente apresente atividade aumentada, o que pode indicar que esse metabólito pode mediar um sinal para indução ou repressão das atividades málicas das enzimas de *E. coli* (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007). Além disso, a ativação de MaeB por aminoácidos e fosfato de açúcar indica que a enzima é mais ativa na presença de ligações de alta energia (acetil-fosfato) e atesta sua participação na gliconeogênese (glutamato e aspartato) (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007).

Huergo e colaboradores (2020) avaliou o efeito de diferentes metabólitos sob concentrações fisiologicamente relevantes na atividade málica da MaeB1 de *A.*

brasiliense. Os resultados mostraram uma forte ativação na presença de KCl e glutamina, forte inibição na presença de acetil-fosfato (inversamente ao que foi observado para EcMaeB por Bologna, Andreo e Drincovich (2007)) e coenzima A e baixa inibição em ensaios com ATP e 2-oxogluturato combinados. A ativação por KCl já havia sido reportada para a MaeB de *E. coli* (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007) e a inibição por coenzima A previamente caracterizada para todas as enzimas tipo MaeB, com exceção de DME de *S. meliloti* (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007; VOEGELE et al., 1999). Por fim, foi reportada forte ativação de AbMaeB1 e EcMaeB por L-glutamina (HUERGO et al., 2020), um metabólito cujos níveis de concentração intracelular atuam como um importante sinal para regular a expressão de genes e a atividades de enzimas centrais no metabolismo do nitrogênio (DIXON et al., 2004; HUERGO et al., 2013; HUERGO e DIXON, 2015; HEESWIJK e al., 2013).

2.5 ENZIMAS MÁLICAS TIPO MaeB E O DOMÍNIO PTA

As enzimas málicas tipo MaeB de muitas bactérias gram-negativas possuem um domínio extra na região C-terminal com homologia às fosfotransacetilases (PTA). Trata-se de um domínio relativamente grande de aproximadamente 320 aminoácidos que, em *E. coli*, possui 31% de similaridade com a proteína EutD (que está envolvida na utilização de etanolamina) e 29% de identidade com a proteína PTA deste organismo (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007).

A presença do domínio PTA nas enzimas málicas tipo MaeB de *E. coli* e *A. brasiliense* chama atenção, uma vez que as enzimas PTA convertem acetil-CoA e fosfato inorgânico a acetil-fosfato e ATP (ROSE et al., 1954). Esse composto atua doando fosforil para proteínas reguladoras de sistemas de dois componentes, servindo, portanto, como um regulador global (AZAM et al., 1999; BENNETT e HOLMS, 1975) e provavelmente desempenhando um papel central em várias vias do metabolismo dessas bactérias. Além disso, as fosfotransacetilases têm um papel central no chamado “*overflow metabolism*”, no qual parte da glicose disponível no meio é utilizada para produzir acetato: a PTA converte acetil-CoA e fosfato inorgânico a acetil-fosfato e ATP e a acetato quinase (Ack) converte acetil-fosfato e ADP em acetato e ATP. Quando a glicose acaba no meio, a bactéria utiliza o acetato disponível produzido para iniciar o processo reverso, denominado *acetato switch*, e produzir mais energia (WOLFE, 2005; CAMPOS-

BERMUDEZ et al., 2010). Nesse cenário, o domínio PTA das enzimas EcMaeB e AbMaeB poderia ter algum envolvimento em vias similares (ARAÚJO, 2018).

As fosfotransacetilases (PTA; EC 2.3.1.8) podem ser divididas em duas classes diferentes, sendo uma delas denominada PTA I (com aproximadamente 350 aminoácidos de comprimento) e a outra de PTA II (com aproximadamente 700 aminoácidos de comprimento) (BRISMADE e ESCALANTE-SEMENERA, 2007). Em *E. coli* é encontrada a enzima PTA II, que possui três domínios conservados: um p-loop contendo NTPase na porção N-terminal – onde ocorre a ligação do nucleotídeo fosfato –, um domínio com função desconhecida denominado DRTGG e um terceiro compartilhado pelas fosfato acetil/buratil transferase no final da porção C-terminal. Já a PTA I apresenta apenas o último domínio, sendo este, portanto, associado a atividade catalítica da enzima (CAMPOS-BERMUDEZ et al., 2010).

As enzimas MaeB de *E. coli* e de *A. brasilense* contêm o domínio com homologia a enzima PTA na porção C-terminal. Segundo ensaios preliminares realizados por Araújo (2018), essa porção, aparentemente, é capaz de catalisar a reação direta de conversão de acetil-CoA a acetil-fosfato, o que indica que essas enzimas podem desempenhar um papel muito mais amplo no metabolismo desses organismos. Além disso, segundo Bologna e colaboradores (2007), o domínio PTA pode estar associado a regulação da atividade málica de EcMaeB por diferentes metabólitos. Os autores sugeriram que os efetores acetil-CoA, glutamato, aspartato e glucose-6-fosfato interagem alostericamente com o domínio PTA dessa enzima, uma vez que mutantes com deleção deste domínio não são afetados por esses metabólitos. Por fim, o controle da atividade málica de EcMaeB pode estar associada ao papel da cauda PTA na oligomerização, onde a associação dos dois domínios deve facilitar o controle metabólico de EcMaeB (BOLOGNA, ANDREO, DRINCOVICH, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar enzimaticamente e funcionalmente a enzima málica MaeB2 de *A. brasilense*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Expressar e purificar a proteína MaeB2 de *A. brasilense*.
- ✓ Caracterizar a atividade málica da enzima MaeB2 de *A. brasilense*.
- ✓ Determinar K_M para os substratos e o efeito de potenciais reguladores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

TABELA 1: BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

<i>Escherichia coli</i>	Genótipo/fenótipo	Referências
BL21 (λ DE3)	hsdS, gal(λ clts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)	Sambrook et al., 2001
DH10B	Smr ; F' [<i>proAB+ lacZM15</i>]	Invitrogen
Plasmídeos		
pET-MaeB	Amp ^r ; Expressa MaeB de <i>Escherichia coli</i> com cauda 6x His C-Terminal	Bologna, Andreo e Drincovich, 2007
pGAMaeB	Km ^r ; pET29a, expressa MaeB de <i>Azospirillum brasilense</i>	Araújo, 2018
pGAMaeBHis	Km ^r ; pET28a, expressa MaeB de <i>Azospirillum brasilense</i> com cauda His N-Terminal	Araújo, 2018
pFGTEV-MaeB2	Amp ^r ; expressa MaeB2 de <i>Azospirillum brasilense</i> com cauda His N-Terminal	Gentilmente cedido por Fernanda Gravina

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido Luria-Broth (LB) (SAMBROOK et al., 1989), a 37 °C sob agitação, sendo mantida a relação 1/5 de volume de meio para volume total do frasco.

O meio LB apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio (NaCl)	10 g/L
Triptona	10 g/L

Para cultivo de *E. coli* em meio sólido foi utilizado o meio LA (meio LB com a adição de 15 g/L de ágar) e as placas mantidas a 37 °C.

4.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos que foram empregados e suas respectivas concentrações finais são: canamicina (Km) 10 µg/mL, ampicilina (Amp) 250 µg/mL, estreptomicina (Sm) 30 µg/mL e ácido nalidixico (Nal) 20 µg/mL. As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por Sambrook et al. (1989) e mantidas a 4 °C.

4.4 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A extração de plasmídeos foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOCK et al., 1989). A partir de uma cultura de *E. coli* em meio LB, crescida durante a noite a 37 °C e sob agitação constante, foi coletado 1,5 mL de cultura saturada para obtenção do *pellet* celular por centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto (MiniSpin Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 300 µL de tampão GET (50 mM de D-glucose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) suplementado com RNase A (100 µg/mL). Em seguida, as células foram lisadas pela adição de 300 µL de solução de lise (0,18M de NaOH e 1% (p/v) de SDS) e homogeneização por inversão, ficando incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. A solução foi neutralizada pela adição de 300 µL de Kacf (3 M de acetato de potássio e 1,8 M de ácido fórmico) e incubação em banho de gelo por no mínimo 5 minutos. Por fim, foram adicionados 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), as amostras homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex e então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante contendo o plasmídeo foi transferido para um tubo novo onde foram adicionados dois volumes de etanol absoluto para precipitação em banho de gelo por 5 minutos, sendo as amostras obtidas por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram lavadas com etanol 80% (v/v), centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, secas em temperatura ambiente e ressuspensas em 30 µL de água ultrapura autoclavada para armazenamento a -20 °C.

4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

As células termocompetentes foram preparadas segundo (CHUNG; NIEMELA; MILLER, 1989) e as alíquotas (200 µL) armazenadas a -80 °C. Para a transformação, as células competentes foram mantidas no gelo por aproximadamente 10 minutos antes do procedimento para descongelarem e o DNA de interesse, previamente purificado, foi então adicionado a mistura de células – que após serem mantidas em gelo por 30 minutos,

foram submetidas a um choque térmico por aquecimento a 42 °C por 2 minutos. Uma vez transformadas, as células foram ressuspensas em 1 mL de LB e recuperadas por 40 minutos a 37 °C, sendo em seguida plaqueadas em meio LA com antibiótico adequado.

4.6 ELETROFORESE DE DNA

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

4.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MaeB2 DE *A. brasilense*

A expressão da proteína MaeB2 de *A. brasilense* foi realizada em células *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pFGTEV-MaeB2, que direciona a síntese de uma proteína recombinante com uma cauda de histidina N-terminal. As células foram inoculadas em 400 mililitros de meio LB, contendo antibiótico, a 37 °C até atingirem D.O.₆₀₀ 0,5-0,7 quando era então adicionado 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) à cultura, que foi novamente incubada a 20 °C *overnight*, sob agitação constante. O *pellet* celular foi obtido por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e então armazenado a -20 °C ou imediatamente ressuspense em tampão de sonicação (100 mM de KCl, 50 mM de Tris HCl pH 8,0 e 20 mM de imidazol).

4.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA MaeB2 DE *A. brasilense*

Para purificação da proteína AbMaeB2, o *pellet* de células foi ressuspense em tampão de sonicação (100 mM de KCl, 50 mM de Tris HCl pH 8,0 e 20 mM de imidazol) e a mistura sonicada no sonicador *Heat System*, ajustado com pulsos a cada 15 segundos por 4 minutos, para obtenção do extrato celular. A fração solúvel foi obtida por centrifugação (20 minutos, 20.000 x g a 4 °C), carregada numa coluna HiTrap Chelating-Ni⁺² de 1 mL (GE Healthcare) e eluída com gradiente crescente de imidazol.

4.9 CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRAÇÃO

A cromatografia de gel-filtração analítica foi realizada em coluna Superose 6 10/30 (GE Healthcare) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM e glicerol 5%

(v/v). A coluna foi calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular (Bio-Rad): Tiroglobulina (158 kDa); ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B12 (1,3 kDa). A corrida e a purificação das proteínas foram realizadas a temperatura ambiente em fluxo de 0,5 mL por minuto.

4.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método Bradford (BRADFORD, 1976), segundo especificações do Reagente de Bradford (Biorad), com curva padrão de albumina bovina (BSA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, em comprimento de ondas de 595 nm.

4.11 ELETROFORESE DESNATURANTE DE PROTEÍNAS

A eletroforese de proteínas foi realizada sob condições desnaturantes (Glicina-SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). As soluções estoque utilizadas foram acrilamida 40%, solução 2 (1,5 M de Tris HCl pH 8,8; 0,3% de SDS), solução 3 (0,5 M de Tris HCl pH 6,8; 0,4% de SDS), persulfato de amônio 10% (v/v) em água, tampão de amostra (2% SDS; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625 M Tris HCl pH 6,0 e 5% de β -mercaptoetanol) e tampão de corrida 10X (30 g de This-Base, 140 g de Glicina e 10 g de SDS por litro). A concentração de acrilamida do gel foi de 12,5% e o sistema de corrida utilizado foi o vertical, de acordo com as recomendações do fabricante (Biorad), por cerca de 40 a 120 minutos e de 100 a 200 V. As amostras proteicas aplicadas no gel foram preparadas pela adição de 7 μ L de tampão de amostra (2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 0,0625 M Tris HCl e 5% de β -mercaptoetanol) para 12 μ L de amostra e aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em solução contendo 0,25% de Coomassie Breilhante R-250, 50% de metanol e 10% de ácido acético.

4.12 ENSAIOS DE LC-MS

Os ensaios de LC-MS foram utilizados para identificar/quantificar os substratos e produtos da atividade málica da cauda PTA das enzimas málicas tipo MaeB. A mistura para a reação direta (formação de acetil-P) foi composta por 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de ditioneitol (DTT), 5 mM de KH₂PO₄ e 0,1 mM de Acetil-CoA. Já a mistura para a reação sentido formação de Acetil-CoA continha 20 mM de

Tris-HCl pH 8,0, 5 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de DTT, 1 mM de Coenzima A e 10 mM de acetil-P. As reações foram incubadas a 30 °C e disparadas pela adição de 0,1 μM de MaeB. Alíquotas de 40 μL das reações foram coletadas nos tempos de 2, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, sendo imediatamente adicionados 10 μL de ácido acético 10% (v/v) gelado para interrupção das reações. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante resultante coletado e colocado em *vial* para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

4.13 ATIVIDADE MÁLICA DE AbMaeB2 *IN VITRO*

As medições de absorvância para monitoramento das reações dos ensaios de atividade málica de AbMaeB2 *in vitro* foram realizadas em microplacas de 96 poços a 30 °C e a absorvância monitorada usando um leitor de microplacas Tecan Infinite F200 para detectar a formação ou consumo de NADH ou NADPH. A atividade foi monitorada por 10 minutos e as velocidades iniciais foram calculadas a partir do *slope* do tempo vs absorvância a 340 nm ao longo da faixa linear de cada ensaio.

A descarboxilação oxidativa de L-malato por AbMaeB2 foi medida em tampão com volume final de 0,3 mL contendo 50 mM de Tris HCl pH 8,0, 100 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de $NADP^+$ ou NAD^+ e 0,5 μM de AbMaeB2 (considerando a massa monomérica), sendo a reação disparada pela adição de 10 mM de L-malato. No caso do controle, ao invés de L-malado, foi adicionada água ultrapura autoclavada à reação. As constantes de Michaelis-Menten de L-Malato, $NADP^+$ e NAD^+ foram determinadas variando suas concentrações, enquanto outros componentes permaneceram em concentrações inalteradas (50 mM de Tris HCl pH 8,0, 100 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$ e 0,5 μM de AbMaeB2). Os parâmetros cinéticos foram calculados pelo menos em duplicata usando o programa GraphPad Prism 8.0.

A reação málica reversa de AbMaeB2 (conversão de piruvato a L-malato) foi testada em tampão contendo 100 mM de Tris HCl pH 8,0, 5 mM de $MgCl_2$, 100 mM de KCl, NADPH ou NADH 0,1 mM, $MgCl_2$, 0,1 mg/mL de BSA, 10 mM de piruvato, 10 mM de $KHCO_3$ e 0,2 μM de AbMaeB (considerando a massa do monômero). As reações foram disparadas pela adição de 0,1 mM de NADPH ou NADH.

A atividade málica de AbMaeB2 foi ainda avaliada na presença de diferentes metabólitos em concentrações próximas à faixa fisiológica descrita para *E. coli* (Bennett

et al., 2009); Acetil-CoA 1 mM, Coenzima A 1 mM, 2-oxoglutarato 2 mM, Acetil-fosfato 2 mM, glutamina 5 mM, ATP 2 mM e ADP 2 mM.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO DE AbMaeB2

A proteína MaeB2 de *A. brasilense* foi expressa células de *E. coli* BL21 a partir de um plasmídio com sistema pTEV, que direciona a síntese de uma proteína recombinante com uma cauda de histidina N-terminal. As células foram lisadas por sonicação em banho de gelo e a fração solúvel do extrato foi utilizada para purificar a proteína MaeB2 usando cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare). A proteína foi eluída com gradiente crescente de imidazol (Fig.1). MaeB2 eluiu entre 50 a 200 mM de imidazol, sendo as frações com maior grau de pureza e concentração aparentes coletadas, dialisadas para a retirada do excesso de imidazol, alíquotadas e armazenadas a -20 °C ou imediatamente utilizadas nos ensaios de atividade.

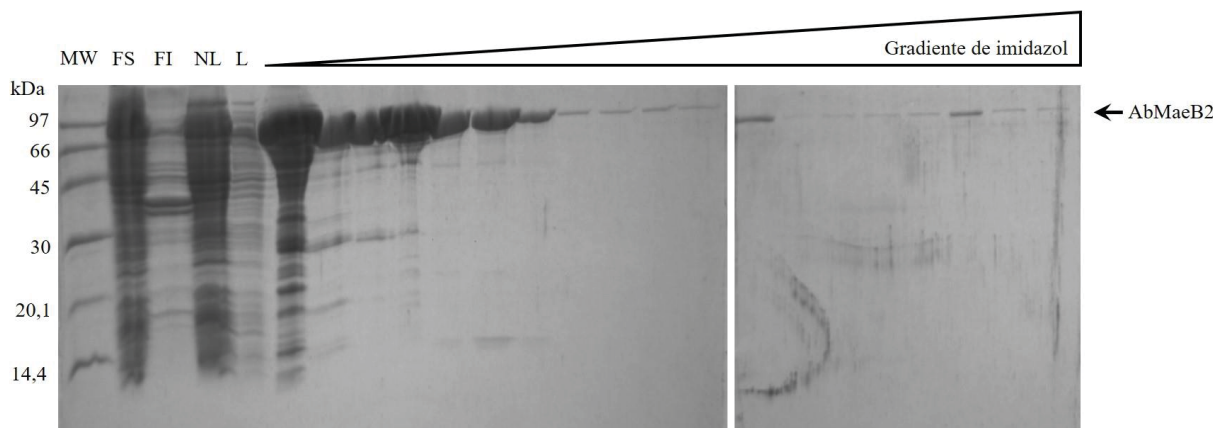


FIGURA 3: Perfil eletroforético da purificação de AbMaeB2His. A fração solúvel total obtida na sonicação foi carregada na coluna HiTrap Chelating-Ni²⁺ de 1 mL, sendo coletadas as frações do não ligado e de lavagem. A faixa de gradiente de eluição foi de 0,05 a 1 M de imidazol em tampão contendo 50 mM de Tris HCl pH 8,0 e 100 mM de KCl. As amostras foram coletadas a cada 1 mL, sendo 12 µL de cada amostra aplicados e analisados em géis SDS-PAGE 12,5%, corados com comassie blue. As frações com maior grau de pureza e concentração aparentes foram coletadas para diálise. A seta indica as bandas de eluição de AbMaeB2His. MW – marcador de massa molecular; FS – fração solúvel; FI – fração insolúvel; NL – não ligado; L – lavagem.

5.2 CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRAÇÃO

A fim de determinar o estado de oligomerização da enzima MaeB2 de *A. brasilense*, foi realizada uma análise por cromatografia de gel-filtração da proteína purificada. Para isto, foi utilizada a coluna Superose 6 10/30 (GE Healthcare) equilibrada com tampão contendo 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM de KCl e glicerol 5% (v/v) e calibrada com as proteínas: tiroglobulina (158 kDa); ovalbumina (44 kDa), mioglobulina

(17 kDa) e vitamina B12 (1,3 kDa). Em seguida, AbMaeB2 purificada foi carregada na coluna, sendo a cromatografia realizada em temperatura ambiente com fluxo de 0,5 mL por minuto.

A proteína AbMaeB2 eluiu num volume de 12,08 mL, indicando uma massa molecular aproximada de 696 kDa (Fig. 2A e B). A massa teórica do monômero é de 83 kDa, o que sugere que essa enzima corresponde a um oligômero de alto peso molecular (provavelmente um octâmero com massa esperada de 664 kDa), assim como observado para as proteínas tipo MaeB de *E. coli* (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007), *S. meliloti* (VOEGEL; MITSCH; FINAN, 1999) e MaeB1 de *A. brasilense* (HUERGO et al., 2020).

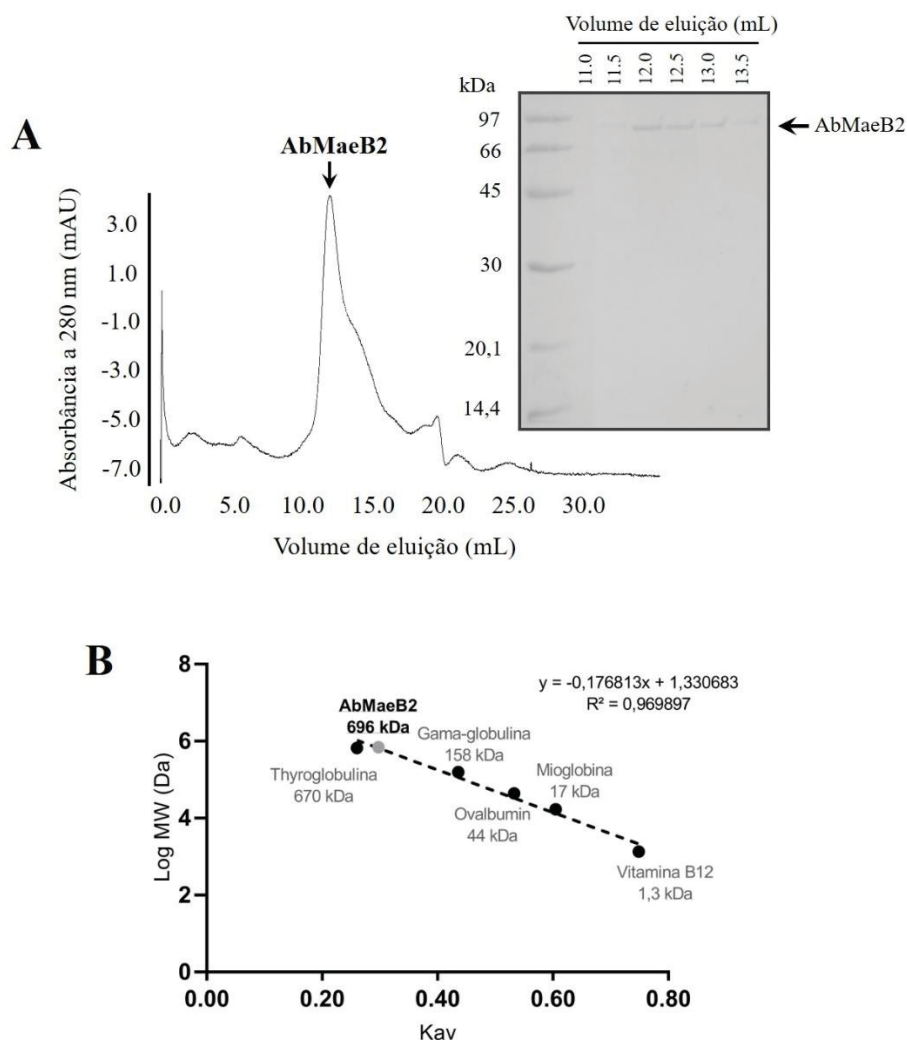


FIGURA 4: Análise da eluição de AbMaeB2 em cromatografia de gel-filtração. (A) Perfil de eluição de AbMaeB2 em coluna Superose 6 previamente equilibrada com tampão contendo 50 mM de Tris HCl pH 8,0; 100 mM de KCl e 5% de glicerol. (B) Gráfico da relação entre o Log da massa vs Kav $((V_e - V_0)/(V_t - V_0))$ dos padrões de massa molecular (BioRad) e da proteína AbMaeB2.

Estes dados suportam que a proteína MaeB2 de *A. brasilense* provavelmente apresenta uma organização semelhante a MaeB de *E. coli*, contendo dois domínios específicos para a atividade málica: domínio N-terminal e o domínio de ligação de NAD⁺/NADP⁺, e um terceiro domínio extra carboxi terminal, que possui homologia com a enzima fosfotransacetilase (PTA).

5.3 AbMaeB2 UTILIZA TANTO NAD⁺ QUANTO NADP⁺ COMO COENZIMAS

Ensaio iniciais foram realizados para detectar a atividade málica de AbMaeB2 *in vitro*. Para tanto, a proteína purificada foi misturada com 35 mM de L-malato em uma reação contendo 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de NAD⁺ ou NADP⁺. A atividade málica da enzima foi determinada medindo a formação de NADH ou NADPH a 340 nm, sendo as reações monitoradas por 10 minutos e as velocidades iniciais calculadas a partir do *slope* do tempo vs a absorbância a 340 nm ao longo da faixa linear de cada ensaio. Na presença de ambas as coenzimas se observou um aumento na absorbância, sendo que nos ensaios com NAD⁺ observou-se uma rápida formação de NADH (nmol/s), enquanto um menor aumento foi detectado na formação de NADPH (nmol/s). Estes dados sugerem que AbMaeB2, provavelmente, pode utilizar ambas as coenzimas como aceptoras de elétrons (NAD(P)⁺-dependente) (Figura 3), porém com uma possível preferência por NAD⁺.

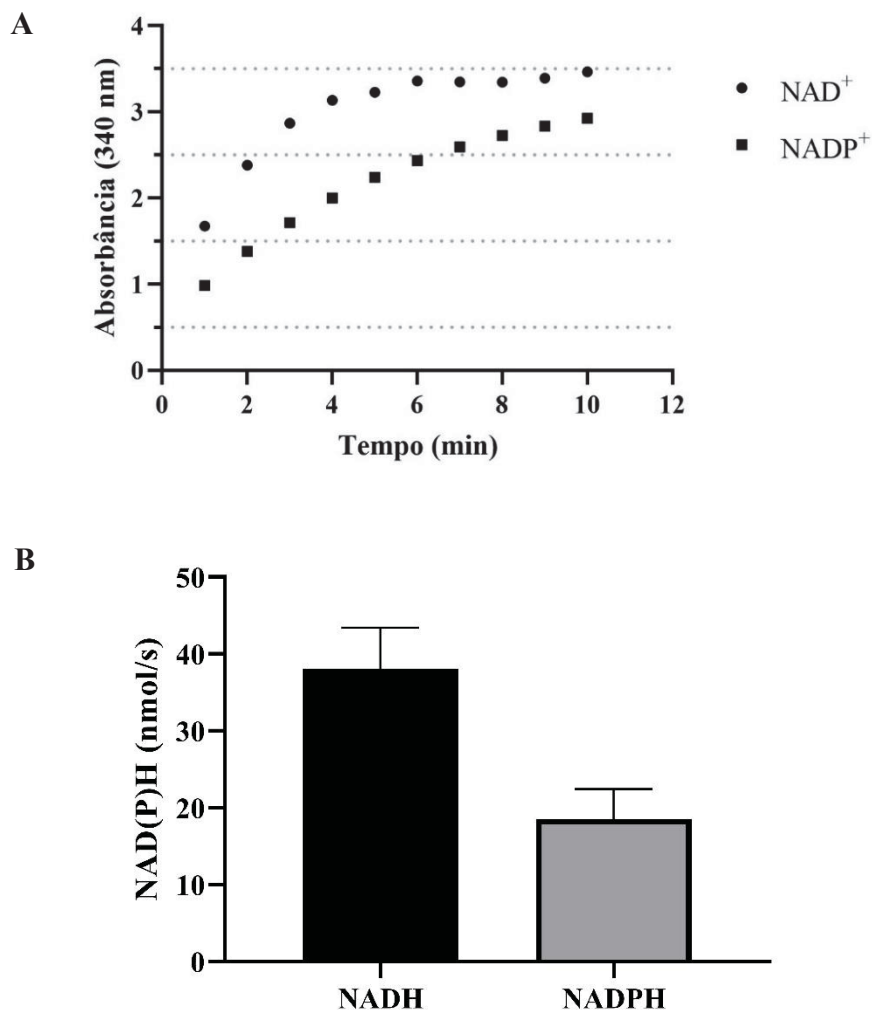


FIGURA 5: Atividade de AbMaeB2 na presença de NAD⁺ e NADP⁺. (A) A atividade de AbMaeB2 foi determinada mensurando o aumento da absorbância (340 nm) em razão do tempo. (B) análise da formação de NADH e NADPH (nmol/s). A faixa linear dos dados obtidos em A foi utilizada para determinar a velocidade inicial da atividade de AbMaeB2 na presença de 35 mM de L-Malato e 0,5 mM de NAD⁺ ou NADP⁺.

A reação málica reversa (carboxilação do piruvato a malato) de AbMaeB2 também foi testada usando 30 mM de piruvato, 30 mM de NaHCO₃ e 0,1 mM de NAD⁺ como substratos e incubando as reações a 30 °C. No entanto, nenhuma alteração significativa na absorbância foi detectada (não mostrado). Sendo assim, AbMaeB2 parece não ser capaz de converter piruvato em malato nas condições de ensaio semelhantes às testadas para a TME MaeB de *S. meliloti* (VOEGELE et al., 1999), assim como observado para a enzima MaeB de *E. coli* (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007) e MaeB1 de *A. brasilense* (HUERGO, et al., 2020), que apresentam baixa atividade reversa.

5.4 O EFEITO DE DIFERENTES ÍON DIVALENTES NA ATIVIDADE MÁLICA DE AbMaeB2

As enzimas málicas requerem Mn^{2+} ou Mg^{2+} para sua atividade (CHANG e TONG, 2003). Foram testadas diferentes concentrações de $MgCl_2$ e $MnCl_2$ sob concentrações saturantes de L-malato (35 mM). Os resultados indicam que ambos os metais, Mg^{2+} e Mn^{2+} , podem ser utilizados como co-fatores por AbMaeB2, com preferência por Mn^{2+} (Fig. 4), o que está de acordo com os resultados obtidos para a MaeB de *E. coli* (BROWN e COOK, 1981) e MaeB1 de *A. brasilense* (HUERGO et al., 2020).

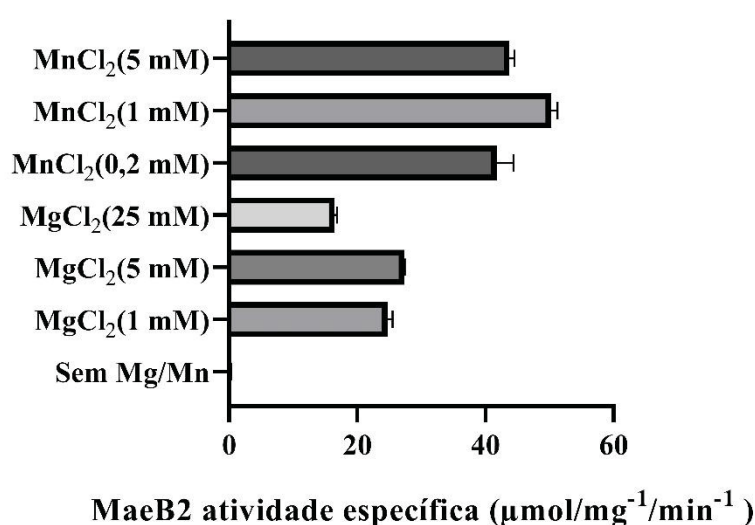


FIGURA 6: Efeito dos íons divalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} na atividade málica da enzima MaeB2 de *A. brasilense*. A atividade málica foi mensurada na presença de diferentes concentrações de $MgCl_2$ e $MnCl_2$ e 0,5 mM de NAD^+ . Os resultados foram plotados com os valores de atividade específica ($\mu\text{mol}/\text{mg}^{-1}/\text{min}^{-1}$).

Levando-se em consideração que as concentrações intracelulares de Mg^{2+} em bactérias gram-negativas como *E. coli* é de 30 mM, cerca de 100 vezes maior que a de Mn^{2+} (0,3 mM) (GOTTO, 1982), optamos por utilizar Mg^{2+} 5 mM para todos os ensaios de atividade subsequentes. Essa concentração foi determinada com base na inibição detectada na presença de concentrações muito superiores a 5 mM, o que também foi observado para EcMaeB (BOLOGNA, ANDREO, DRINCOVICH, 2007). Também, esta concentração foi a mesma utilizada nos ensaios anteriormente realizados com a enzima MaeB1 de *A. brasilense*, o que facilita uma análise comparativa entre a atividade das duas enzimas.

5.5 A ATIVIDADE MÁLICA DE AbMaeB2 É ATIVADA POR KCl

A ativação da atividade málica por KCl foi relatada anteriormente para a enzima MaeB de *E. coli* (BOLOGNA, ANDREO, DRINCOVICH, 2007) e para a MaeB1 de *A. brasilense* (HUERGO et al., 2020), sendo a atividade máxima dessas enzimas detectada em tampão contendo 100 mM de KCl. Da mesma forma, AbMaeB2 se mostrou muito mais ativa em tampão contendo K^+ em comparação com Na^+ (dados não mostrados). Dado que a concentração de 100 mM de KCl se assemelha mais às condições fisiológicas *in vivo* (SCHULTZ e SOLOMON, 1961) e considerando que esta mesma condição foi usada para estudo da enzima málica MaeB1 de *A. brasilense*, a mesma concentração foi utilizada em todos os ensaios subsequentes.

5.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE AbMaeB2

A atividade das enzimas málicas representa uma reação chave na distribuição de carbono entre as reações glicolíticas ou gliconeogênicas e para o fornecimento de intermediários do ciclo do ácido cítrico ou de substratos que entram no metabolismo central via acetil-CoA (BOLOGNA, ANDREO, DRINCOVICH, 2007). Em procaríotos, a síntese de piruvato a partir da decarboxilação oxidativa do malato pelas enzimas tipo MaeB alimenta a gliconeogênese e fornece o poder redutor para reações biossintéticas (WANG et al., 2011). A reação de AbMaeB1 e EcMaeB é inibida na presença de acetil-CoA. Assim, a produção de piruvato por MaeB é mais elevada apenas quando acetil-CoA encontra-se em baixos níveis (HUERGO et al., 2020).

O K_M para L-Malato das enzimas MaeB é de 3,4 mM para *E. coli* (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007), 2,6 mM para *S. meliloti* (VOEGELE et al., 1999), 3,8 mM para *Corynebacterium glutamicum* (GOURDON et al., 2000) e 2,9 mM para MaeB1 de *A. brasilense* (HUERGO et al., 2020). Como a faixa de concentrações intracelulares de malato medidas em *E. coli* sob diferentes regimes de carbono é de 1,7 a 3,4 mM (BENNETT et al., 2009), e considerando que a faixa de concentrações fisiológicas para o mesmo substrato em outras bactérias gram-negativas como *A. brasilense* corresponda ao mesmo padrão, esses dados apontam um provável papel central das enzimas tipo MaeB na distribuição de carbono no nó metabólico fosfoenolpiruvato / piruvato / oxaloacetato nesses microrganismos, onde a atividade das enzimas tipo MaeB

seriam reguladas por variações nas concentrações celulares do substrato de acordo com o K_M da enzima.

A fim de estimar os parâmetros cinéticos da enzima AbMaeB2 e assim determinar seu possível papel no metabolismo de *A. brasilense*, curvas de concentração de substratos foram realizadas como mostrado nas figuras 5A-D. Uma resposta hiperbólica típica de Michaelis-Menten foi observada nas análises cinéticas realizadas quando plotadas as velocidades iniciais contra as concentrações crescentes de L-malato. Os valores de K_M e V_{max} para este substrato foram mensurados na presença de concentrações saturantes de NAD^+ ou $NADP^+$ (3 mM). Na presença de NAD^+ , o K_M para o L-malato foi estimado em 25,4 mM e a V_{max} em 119,8 nmol/s. Já na presença de $NADP^+$ como coenzima, o K_M para o L-malato foi estimado em 21,9 mM e a V_{max} em 22,4 nmol/s (Figura 5, A e B). Esses valores de K_M para L-malato se apresentaram muito maiores do que os valores fisiológicos, sendo ainda bem superiores quando comparada com as outras enzimas tipo MaeB anteriormente estudadas e descritas na literatura.

A necessidade de ligação de algum metabólito como co-fator regulatório poderia justificar a baixa afinidade de AbMaeB2 pelo L-malato. As isoformas de MaeB encontradas em *S. meliloti* (DME e TME), *E. coli* (EcMaeB) e *A. brasilense* (AbMaeB1) estão sujeitas a regulação por uma gama de metabólitos (BOLOGNA, ANDREO, DRINCOVICH, 2007; VOEGELE et al., 1999; HUERGO et al., 2020). Em *E. coli*, por exemplo, a atividade de MaeB é afetada por oxaloacetato, fumarato, glicose-6-fosfato, aspartato, acetil-CoA e acetil-fosfato, sendo que este último, quando em altas concentrações, aumenta a atividade málica da enzima (BOLOGNA, ANDREO, DRINCOVICH, 2007), o que indica que a enzima é mais ativa na presença de ligações de alta energia. Outra possibilidade é de que essa enzima seja inibida pelo produto – como ocorre com as enzimas DME e TME de *S. meliloti*, que são inibidas por piruvado e $NAD(P)H$ (VOEGEL; MITSCH; FINAN, 1999) – ou tenha atividade reduzida na ausência de algum outro fator necessário à regulação e ativação da atividade málica. Ensaio de *pull-down* realizados por Gerhardt e Colaboradores (2020) indicaram que a enzima MaeB1 de *A. brasilense* interage com a proteína PII GlnZ, uma proteína transdutora de sinais que está diretamente relacionada com a regulação do metabolismo de nitrogênio. Dados preliminares também sugerem que a enzima AbMaeB2 interage com a proteína regulatória GlnZ (dados não mostrados). Esta interação pode indicar um ponto de controle para ajudar o metabolismo do carbono com a assimilação de nitrogênio em *A.*

brasiliense. Uma investigação mais detalhada seria necessária para se confirmar esta hipótese.

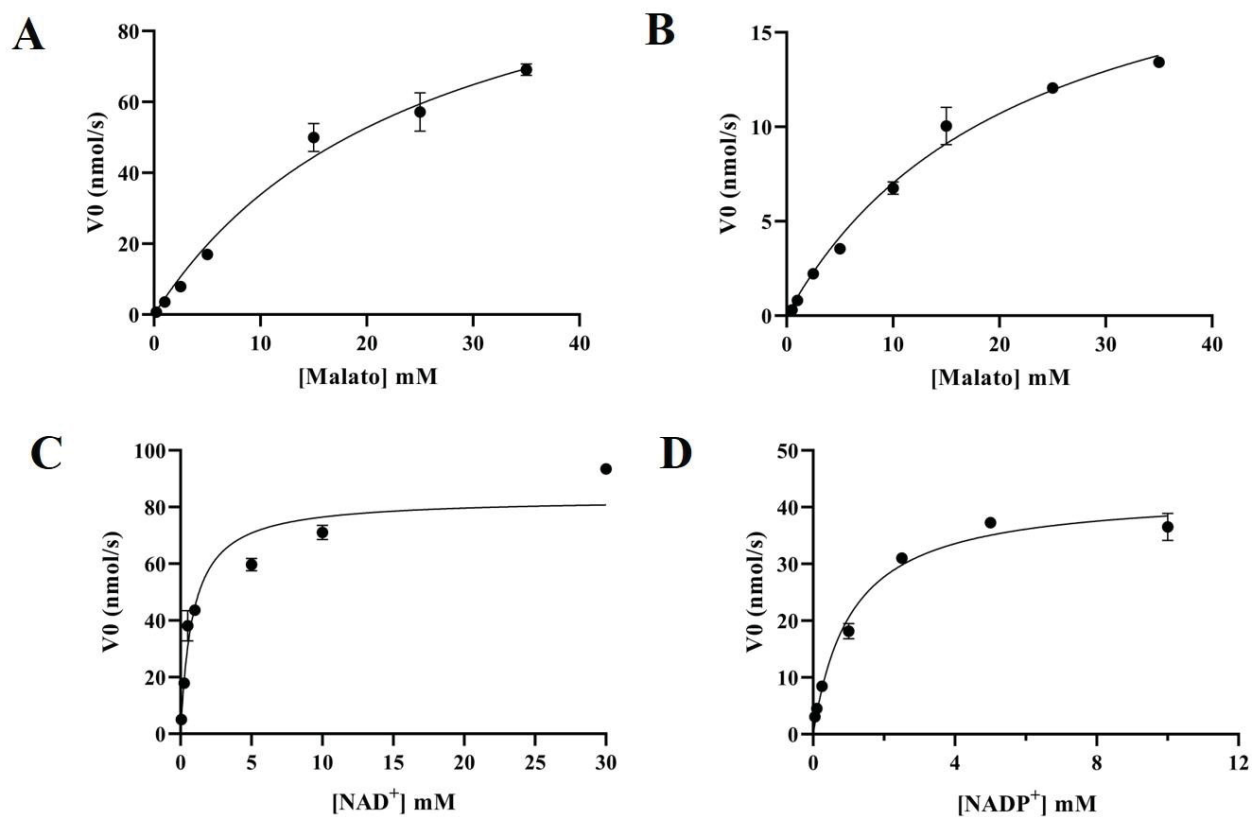


FIGURA 7: Determinação dos parâmetros cinéticos de AbMaeB2. A velocidade inicial (V_0) foi plotada contra as concentrações de L-Malato, NAD^+ ou $NADP^+$. A atividade málica foi mensurada na presença de 3 mM de NAD^+ ou $NADP^+$ (A e B, respectivamente) e 35 mM de L-Malato (C e D).

O K_M e a V_{max} para NAD^+ e $NADP^+$ também foram estimados, sob concentrações saturantes de L-malato (35 mM), apresentando valores para K_M de 0,8 mM e V_{max} 83,1 nmol/s para NAD^+ e K_M de 1,1 mM e V_{max} de 42,5 nmol/s para $NADP^+$ (Figura 5, C e D). Estes dados suportam a hipótese de que AbMaeB2 utiliza preferencialmente NAD^+ como substrato, uma vez que as concentrações fisiológicas determinadas para estas coenzimas em *E. coli* é de 2,6 mM e 2,1 μ M para NAD^+ e $NADP^+$, respectivamente (BANNETT, 2009). Assim, o K_M de 0,8 mM para NAD^+ estaria levemente abaixo da concentração considerada fisiológica para este metabólito, permitindo a atividade da enzima em condições fisiológicas. Por outro lado, o K_M de 1.1 mM para $NADP^+$ estaria cerca de 500x acima da concentração celular deste metabólito, portanto, a enzima provavelmente não opera usando $NADP^+$ em condições fisiológicas. Além disso, o K_M para $NADP^+$ de AbMaeB2 está bem acima dos reportados na literatura para outras

enzimas málicas NADP⁺-dependentes (Tabela 2). Apesar do K_M para NAD⁺ de AbMaeB2 também estar acima dos valores determinados para outras enzimas NAD⁺-dependentes descritas na literatura (Tabela 2), ele ainda é menor que a concentração celular estimada para este substrato. Vale ressaltar que as enzimas reportadas na Tabela 2, em muitos casos, têm uma regulação complexa e, portanto, o K_M pode variar na presença de ativadores e inibidores.

TABELA 2: COMPARAÇÃO DOS VALORES CINÉTICOS DE K_M ESTIMADOS PARA AS ENZIMAS TIPO MAEB DE BACTÁRIAS GRAM-NEGATIVAS

Organismo – proteína	Valores ¹	
	K _M NAD ⁺	K _M NADP ⁺
<i>Escherichia coli</i> – ScfA	68,8 μM	1 mM
<i>Escherichia coli</i> – MaeB	ND	41,5 μM
<i>Azospirillum brasilense</i> – MaeB1	ND	157 μM ²
<i>Azospirillum brasilense</i> – MaeB2	800 μM ³	1,1 mM ³
<i>Sinorhizobium meliloti</i> – DME	89 μM	1,56 mM
<i>Sinorhizobium meliloti</i> – TME	ND	33 μM

¹ Valores cinéticos de K_M estimados para diferentes enzimas málicas tipo MaeB. Fonte: Brenda Database (THOMPSON; SANDERS; MCDONALD et al., 2017).

² Fonte: Huergo et al., 2020.

³ Este trabalho.

A ocorrência de duas isoformas de enzimas málicas em bactérias gram-negativas, uma NADP⁺-dependente e outra NAD(P)⁺-dependente, foi reportada anteriormente para *E. coli* e *S. meliloti*. Em *E. coli* a enzima ScfA é um tetrâmero que liga tanto NAD⁺ quanto NADP⁺, enquanto MaeB é, provavelmente, um octâmero NADP⁺-dependente (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007). Já em *S. meliloti*, tratam-se de dois octâmeros com estrutura quimérica similar à MaeB de *E. coli*, sendo uma delas NAD(P)⁺-dependente (DME) e outra NADP⁺-dependente (TME) (VOEGEL; MITSCH; FINAN, 1999). Os resultados aqui descritos, em conjunto com os dados obtidos por Huergo e colaboradores (2020), sugerem que no caso de *A. brasilense* a enzima AbMaeB1 seria uma isomorfa dedicada em utilizar NADP⁺ enquanto a AbMaeB2 seria dedicada na utilização de NAD⁺

Assim, semelhante ao descrito em *E. coli* e *S. meliloti*, *A. brasilense* também opera seu metabolismo com uma enzima málica específica para NADP⁺ e uma segunda com forte preferência para NAD⁺. Análises comparativas de alinhamento múltiplo de

sequências mostram que as regiões de ligação de NAD(P)^+ são caracterizadas por um sequência rica em glicina (GXGXXG), que é consenso para ligação de fosfato. Foi descrito na literatura que sítios de ligação para NADP^+ costumam apresentar como característica dois resíduos de alanina separados por 3 aminoácidos (XGXXAXXXA), enquanto resíduos de glicina são preferidos em enzimas NAD^+ -dependentes (SCRUTTON; BERRY; PERHAM, 1990; WIERENGA; MAEVER; HOL, 1995). O que é possível observar pela análise de sequência é que as enzimas de *A. brasilense* não seguem exatamente esta regra, porém, na enzima AbMaeB1 há um maior número de alaninas neste sítio (GAGAAGIA) em relação a AbMaeB2 (GGGAAGIA) o que poderia explicar a preferência por NAD^+ da segunda enzima (ARAÚJO, 2018).

Com base na modulação da atividade das enzimas málicas NAD(P)^+ -dependentes SfcA de *E. coli* e DME de *S. meliloti* por múltiplos efetores, estas enzimas aparentam desempenhar uma função importante na regulação dos níveis de intermeários do ciclo do ácido cítrico por serem capazes de responder aos níveis de diferentes metabólitos como acetil-CoA, acetil-fosfato, fumarato, succinato e aspartato (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007; VOEGEL; MITSCH; FINAN, 1999). Sendo assim, AbMaeB2 pode desempenhar um papel semelhante no metabolismo de *A. brasilense*.

De maneira geral, assume-se que as enzimas málicas procarióticas NADP^+ -dependentes fornecem o poder redutor para a biossíntese de vários componentes celulares, enquanto as NAD^+ -dependentes promovem a entrada de carbono derivado de aminoácidos ou C4 dicarboxilatos na gliconeogênese (FUKUDA et al., 2005). Nesse cenário, as duas isoformas de MaeB observadas em *A. brasilense* (AbMaeB1 (NADP^+ -dependente) e AbMaeB2 (NAD(P)^+ -dependente)) poderiam ter funções distintas no metabolismo do carbono dessa bactéria sob determinadas condições fisiológicas. Quando as bactérias estão usando acetato como fonte de carbono, os níveis de acetil-CoA são baixos. Sob essa condição, AbMaeB1 é ativa e pode produzir piruvato a partir de malato, fornecendo piruvato para a gliconeogênese e NADPH para as reações biossintéticas (WANG et al., 2011; HUERGO et al., 2020). Por outro lado, em condições de altos níveis de acetil-CoA, a atividade de AbMaeB1 é fortemente inibida (HUERGO et al., 2020). Assim a atividade de AbMaeB2 pode ser importante quando MaeB1 está menos ativa. É provável que AbMaeB2 tenha maior importância no metabolismo fornecendo NADH para o metabolismo oxidativo e contribuindo para a obtenção de energia.

5.7 EFEITOS DE DIFERENTES METABÓLITOS NA ATIVIDADE MÁLICA DE AbMaeB2

Muitas enzimas málicas procarióticas apresentam controle alostérico por metabólitos chaves. A atividade málica da enzima MaeB de *E. coli*, por exemplo, é inibida por acetil-CoA, oxaloacetato e fumarato, e ativada pelos aminoácidos glutamato e aspartato, glucose-6-fosfato e acetil-fosfato; enquanto SfcA é ativada apenas por aspartato e inibida por acetil-fosfato, coenzima A (CoASH), oxaloacetato e palmitoil-CoA (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007). O mesmo se aplica as enzimas málicas tipo MaeB de *S. meliloti*, que são inibidas por oxaloacetato e pelos produtos: piruvato, bicarbonato e NAD(P)H, sendo que DME é também inibida por derivados de CoA. Em contrapartida, ATP, ADP, fumarato, succinato, aspartato e frutose-1,6-bifosfato estimulam a atividade de DME (VOEGELE et al., 1999). Com base nisso, foram realizados ensaios iniciais, como mostrado na figura 7, nos quais foram testados os efeitos de diferentes prováveis efetores, em concentrações fisiológicas relevantes, na atividade málica de AbMaeB2. Os dados foram analisados utilizando o test-t (GraphPad Prism 8.0), sendo as probabilidades $<0,05$ aceitas como significativas.

Diferentemente do que foi relatado para a MaeB de *E. coli*, DME de *S. meliloti* e para a MaeB1 de *A. brasilense*, AbMaeB2 não apresentou diminuição da atividade málica quando submetida a ensaios com acetil-CoA, mas sim um leve aumento (embora não significativo) (Fig. 7). Huergo e colaboradores (2020) mostraram que este metabólito altera o K_M das enzimas AbMaeB1 e EcMaeB para L-malato, tendo um efeito inibitório, o que sugere que as enzimas tipo MaeB podem funcionar como sensores de acetil-CoA, controlando a distribuição de carbono no nó metabólico PEP / piruvato / oxaloacetato de acordo com a disponibilidade desse metabólito. No mesmo trabalho, foi demonstrado que essa inibição em AbMaeB1 é revertida por coenzima A, implicando que essa enzima é capaz de detectar a razão acetil-CoA/CoASH. No entanto, quando testadas concentrações de coenzima A, também não foi possível detectar nenhuma alteração significativa na atividade málica de AbMaeB2 (pvalue $>0,05$) (Fig. 7).

Dos demais prováveis efetores testados, apenas os ensaios contendo acetil-fosfato, ATP e ADP apresentaram alterações significativas (pvalue $< 0,05$) na atividade málica de AbMaeB2, promovendo uma aparente diminuição da atividade (Fig. 7). Esse efeito chama atenção sobretudo no caso do acetil-fosfato, que parece ser um sinalizador global em bactérias gram-negativas como *E. coli*. Em determinadas condições fisiológicas, altas

concentrações de acetil-fosfato fazem com que a isoforma MaeB dessa bactéria apresente atividade aumentada, o que pode indicar que esse metabólito pode mediar um sinal para indução ou repressão das atividades málicas das enzimas de *E. coli* (BOLOGNA, ANDREO e DRINCOVICH, 2007).

Apesar dos ensaios preliminares com glutamina como efetor não terem apresentado alterações significativas na atividade málica de AbMaeB2, a regulação da atividade de enzimas tipo MaeB por glutamina parece ser uma propriedade conservada nessa classe de enzimas, o que sugere uma provável ligação entre o metabolismo do nitrogênio e do carbono. Dados preliminares (Huergo, comunicação pessoal) sugerem que AbMaeB1 é ativada por glutamina em tampão contendo íons potássio residuais, não sendo possível observar o mesmo efeito em tampão contendo NaCl ou elevada concentração de K^+ .

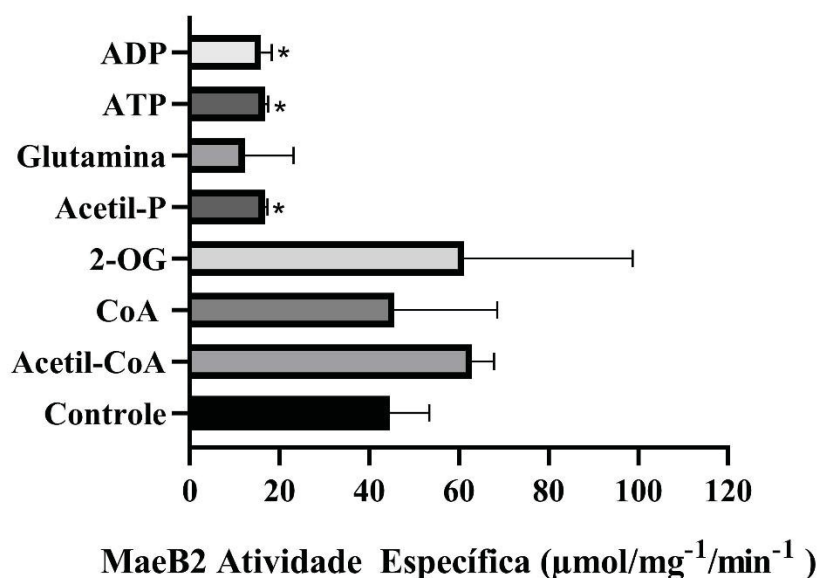


FIGURA 8: Propriedades regulatórias de AbMaeB2. A atividade málica foi mensurada na presença de 35 mM de L-Malato e 0,5 mM de NAD^+ . Os resultados foram plotados com os valores de atividade específica ($\mu\text{mol}/\text{mg}^{-1}/\text{min}^{-1}$). As concentrações dos efetores indicados no eixo y foram: Acetil-CoA 1 mM, Coenzima A 1 mM, 2-oxoglutarato 2 mM, Acetil-fosfato 2 mM, glutamina 5 mM, ATP 2 mM e ADP 2 mM. *Os dados foram analisados usando o test-t para comparar par a par o controle com os diferentes metabólitos (GraphPad Prism 8.0). Probabilidades com valor de $p < 0,05$ foram aceitas como significativas.

Em resumo, os dados preliminares aqui apresentados sugerem uma provável regulação de AbMaeB2 por acetil-fosfato, ATP e ADP. No entanto, mais ensaios são necessários para determinar se esses efeitos apresentam, de fato, relevância fisiológica na regulação da atividade málica da enzima MaeB2 de *A. brasilense*.

5.8 O DOMÍNIO PTA DE AbMaeB2 NÃO É CATALITICAMENTE ATIVO

Araújo (2018) identificou através de análises por LC-MS a atividade direta de PTA das enzimas MaeB de *A. brasilense* (AbMaeB1) e *E. coli* (EcMaeB), mostrando que essas enzimas são capazes de produzir acetil-CoA quando incubadas com acetil-fosfato e coenzima A, o que contrasta com os resultados obtidos por Bologna, Andreo e Drincovich (2007), que não reportaram atividade PTA em seus ensaios. A atividade catalítica de formação de acetil-CoA foi testada para AbMaeB2 em paralelo com AbMaeB1 incubando 0,1 μ M de proteína em reações contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de DTT, 1 mM de coenzima A e 10 mM de acetil-fosfato a 30 °C. Alíquotas foram coletadas nos tempos de 2, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos e analisadas por LC-MS conforme descrito por Rodrigues e colaboradores (2014) com o objetivo de identificar/quantificar os substratos e os produtos da atividade PTA. No entanto, nenhuma atividade de fosfotransacetilase foi registrada para as enzimas MaeB de *A. brasilense* (dados não mostrados). Sendo assim, novos ensaios devem ser realizados a fim de determinar se o domínio C-terminal da MaeB2 de *A. brasilense* efetivamente apresenta atividade PTA ou se esse domínio tem papel apenas na regulação da atividade málica e na oligomerização correta destas proteínas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A enzima málica MaeB2 de *A. brasilense* purificada neste trabalho é NAD(P)⁺-dependente e requer Mg²⁺ ou Mn²⁺ para sua atividade.
- ✓ A proteína AbMaeB2 parece ser octamérica, formando um oligômero de alta massa molecular.
- ✓ Os dados dos parâmetros cinéticos indicam que AbMaeB2 apresenta menor afinidade pelos substratos L-malato, NADP⁺ e NAD⁺ quando comparada com outras enzimas málicas de *E. coli*, *A. brasilense* e *S. meliloti*
- ✓ A atividade da enzima málica AbMaeB2 é ativada por KCl e aparentemente inibida por acetil-fosfato, ATP e ADP. Porém, mais ensaios são necessários para determinar se esses efeitos apresentam, de fato, relevância fisiológica no controle da enzima MaeB2 de *A. brasilense*
- ✓ Diferentemente do que foi anteriormente descrito para a enzima MaeB de *E. coli* e AbMaeB1, ensaios preliminares indicam que AbMaeB2 não apresenta inibição por acetil-CoA.
- ✓ Assim como descrito para EcMaeB e AbMaeB1, AbMaeB2 parece não ser capaz de catalisar a reação reversa de carboxilação do piruvato a malato.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, G. A. T. Caracterização *in vitro* das enzimas málicas MaeB e N-acetil Glutamato Quinase NAGK e interação com proteínas PII em *Azospirillum brasilense*. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2018.
- ALMEIDA, A.T. Estudo molecular da associação de *Azospirillum brasilense* FP2 com raízes de arroz (*Oryza sativa* L. CV. NIPPONBARE) através de uma abordagem proteômica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.
- ALVAREZ, C. Kinetics and functional diversity among the five members of the NADP-malic enzyme family from *Zea mays*, a C4 species. *Photosynthesis Research*. May, 2013.
- AZAM, T. A., IWATA, A. NISHIMURA, S. UEDA, A. ISHIHAMA. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* v. 181, p. 6361–6370, 1999.
- BABA, T. et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*. v. 2, fev. 2006.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J Microbiol.* v. 50, p. 521-577, 2004.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*. v. 108, p. 77-136, 2010.
- BENNETT, P. M., W. H. HOLMS. Reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* ML308 during growth on acetate. *J. Gen. Microbiol.* v.87, p. 37–51, 1975. *Biological Chemistry*, v. 279, n. 9, p. 8262–8268, 2004.
- BENNETT, B.; KIMBALL, E.; GAO, M. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 8, p. 593–599, 2009.
- BOLOGNA, F. P., ANDREO, C. S., DRINCOVICH, M. F. *Escherichia coli* malic enzymes: Two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. *J. Bacteriol.* v. 189, n. 16, p. 5937–5946, ago. 2007
- BOTTINI, R., FULCHIERI, M., PEARCE, D., and PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* v. 90, p. 45–47, 1989.
- 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, p. 248–254, 1976.
- BRINSMADÉ, S. R. and ESCALANTE-SEMERENA, J. C. *In vivo* and *in vitro* analyses of single-amino acid variants of the *Salmonella enterica* phosphotransacetylase enzyme provide insights into the function of its N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*. Apr, 2007.

- BROWN, D. A., and COOK, R. A. Role of Metal Cofactors in Enzyme Regulation. Differences in the Regulatory Properties of the *Escherichia coli* Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Specific Malic Enzyme, Depending on Whether Magnesium Ion or Manganese Ion Serves as Divalent Cation. *Biochemistry* 20, 2503–2512, 1981.
- CHANG, G., TONG L. Structure and Function of Malic Enzymes, A New Class of Oxidative Decarboxylases. American Chemical Society. v. 42, n. 44, nov. 2003
- CAMPOS-BERMUDEZ, V. A. et al. Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. *FEBS Journal*. v. 277, n 8, p. 1957-1966, abr. 2010.
- CHANG G. and TONG, L. Structure and Function of Malic Enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry*, v. 42, n. 44. Dec, 2003.
- CHI, W., YANG, J., ZHANG, F. Four rice encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 68, n. 9, p. 1865-1874, jun. 2004.
- 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, abr. 1989
- CUSHMAN, J. C. Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *European Journal of Biochemistry*, v. 208, n. 2. Sep, 1992.
- DOBBELAERE, S. *et al.* Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.J. (Eds). *Intl. Symp. Nitrogen Fixation*. Pullman: USA: Washington Univ. Press, v.2, p.518-538, 1976.
- DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. (Ed.). *The Prokaryote*, 1991.
- DRINCOVICH, M. F. et al. C4 decarboxylases: different solutions for the same biochemical problem, the provision of CO₂ in the bundle sheath cells. in “C4 photosynthesis and Related CO₂ concentrating mechanisms”, p. 277-300, 2010.
- DRISCOLL, B. T. e FINAN T. M. NAD(+)-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* v. 7, p. 865-873, 1993.
- ECKERT, B., WEBER, O. B., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M., HARTMANN A. *Azospirillum dobereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 51, Issue 1, jan. 2001.
- FUKUDA, W. et al. Characterization of a archaeal malic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Archaea*. v. 1, n.5, p. 293-301, mai. 2005

GERHARDT, E. C. M. Identificação e estudo in vitro da interação entre proteínas PII e proteínas alvo. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

GOODRIDGE, A. G. et al. Nutritional and Hormonal Regulation of Expression of Gene for Malic Enzyme. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. v. 52, p. 89-122, 1996

GOURDON, P. et al. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl Environ Microbiol*. v. 66, n.7, p. 2981-2987, 2000

HAO, G. et al. Role of Malic Enzyme during Fatty Acid Synthesis in Fungus *Mortierella alpina*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 80, n. 9, p. 2672-2678, may. 2014

HASAN, N. M., LONGACRE, M. J., STOKER, S. W., KENDRICK, M. A. & MACDONALD, M. J. Mitochondrial Malic Enzyme 3 Is Important for Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells. *Mol. Endocrinol*. 29, 396–410, 2015.

HUERGO, L. F., ARAÚJO, G. A. T., SANTOS, A. S. R., GERHARDT, E. C. M., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M., FORCHHAMMER, K. The NADP-dependent malic enzyme MaeB is a central metabolic hub controlled by the acetyl-CoA to CoASH ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, may. 2020.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa soja, 2011.

HSIEH, J., SHIH, W., KUO, Y., LIU, G. Functional of Metabolic Intermediates in Regulating the Human Mitochondrial NAD(P)⁺-dependent Malic Enzyme. *Scientific Reports*, vol. 9, n. 1. Dec, 2019.

IGLESIAS A. A. and ANDREO, C. S. Substrate binding to NADP-malic enzyme from maize leaves as determined by intrinsic fluorescence quenching. In: Batscheffsky M (ed) *Current Research in Photosynthesis*, vol 4, pp 537–540. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1990.

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.

LAI, L. B., LIN, W., NELSON, T. M. Distinct but conserved functions for two chloroplastic NADP-malic isoform in C3 and C4 *Flaveria* species. *Plant Physiol*. v. 128, p. 125-139, jan. 2002

LOEBER, G., DWORKIN, M. B., INFANTE, A. & AHORN, H. Characterization of cytosolic malic enzyme in human tumor cells. *FEBS Lett*. 344, 181–186 (1994).

MARTINOIA, E. and RENTSCH D. Malate compartmentation responses to a complex metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 447–467, 1994.

MICHAEL, K. M. et al. Chimeric Structure of the NAD(P)⁺- and NADP⁺-dependent Malic Enzymes of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti**. *Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 15, p.9330-9336, 1998

MITSCH, M. J., VOEGELE, R. T., COWIE, A., OSTERAS, M., and FINAN, T. M. Chimeric structure of the NAD(P)⁺- and NADP⁺-dependent malic enzymes of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *J. Biol. Chem*. 1998.

- MITSCH, M. J., COWIE, A., FINAN, T. M. Enzyme Cofactor and Domain Requirements for Symbiotic Fixation by *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. v. 189, n. 1, p. 160-168, jan. 2007
- MOREADITH, R. W., LEHNINGER, A. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J. Biol Chem*. May, 1984
- MURAI, S. et al. Inhibition of malic enzyme 1 disrupts cellular metabolism and leads to vulnerability in cancer cells in glucose-restricted conditions. *Oncogenesis*. v. 6, mai. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2017.34>.
- VOEGELE, R. T., MITSCH, M.J, FINAN, T. M. Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mole. Enzymol*. 1432, p. 275-285, 1999.
- PANKIEVICZ et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *The Plant Journal*, 81(6). Jan, 2015.
- PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntr (gln) type gene products (*Azospirillum brasilense*; Nif- mutants; nifA; ntrC; MoFe protein). *FEMS Microbiology Letters*, v. 23, p. 95–101,1984.
- POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge. Cambridge Univ. Press. 252p, 1982.
- PRINSEN, E., COSTACURTA, A., MICHIELS, K., VANDERLEYDEN, J., and VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: Evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant Microbe Inter*.v. 6, p. 609–615, 1993.
- SAIGO, M. et al. Plastidial NADP-malic enzymes from grasses: unraveling the way to the C4 specific isoforms. *Plant Physiol. Biochem*. v. 63, p. 39-48, 2013.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANTIANANTIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, n. 2, 1989.
- SAMBROOK, J., MACCALLUM, P., RUSSEL, D. *Molecular cloning: A laboratory manual*, e nd ed. Cold Springs Harbour Press, NY, p. 2344, 2001
- SAUER, U., EIKMANNNS, B. J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol*. v. 29, p. 765-794, 2005
- SCHULTZ, S. G., SOLOMON, A. K. Cation transport in escherichia coli L intraceuular Na and K concentrations and net cation movement, *J Gen Physiol* 45 (2) 355–369, 1961.
- SCRUTTON, N. S., BERRY, A. and PERHAM, R. N. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343:38–43, 1990.
- SHULB, S. et al. First evidence for a multienzyme complex of lipid biosynthesis pathway enzymes in *Cunninghamella bainieri*. *Scientific Reports*. v. 8 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-21452-4.pdf>
- SPAANS, S. K., WEUSTHUIS, R. A., VAN DER OOST, J., and KENGEN, S. W. M. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front. Microbiol*. 6, 1–27, 2015.

- STRZELCZYK, E., KAMPERT, M., LI, C. Y. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* v. 149, p. 55–60, 1994.
- SWEETLOVE, L. J. et al. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci.* v. 15, p. 462–470, 2010
- TAO, X., YANG, Z. & TONG, L. Crystal Structures of Substrate Complexes of Malic Enzyme and Insights into the Catalytic Mechanism. *Structure* 11, 1141–1150, 2003.
- TIEN, T. M., GASKINS, M. H., and HUBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). *Appl. Environ. Microbiol.* v. 37, p. 1016–1024, 1979.
- TROCONI, M. A. et al. *Arabidopsis* NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact during nocturnal metabolism. *Plant Physiol.* v. 146, p. 1540–1552, 2008
- TROCONI, M. A., ANDREO, C. S., DRINCOVICH, M. F. Chimeric Structure of Plant Malic ENzyme Family: Different Evolutionary Scenarios for NAD- and NADP-Dependent Isoforms. *Frontiers in Plant Science.* v. 9, mai. 2018.
- VOEGELE, R. T., MITSCH, M. J., and FINAN, T. M. Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1999.
- XU, Y., BHARGAVA, G., WU, H., LOEBER, G. and TONG, L. Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure* 7, 877–889, 1999.
- WANG, B. Et al., Biochemical properties and physiological roles of NADP-dependent malic enzyme in *Escherichia coli*, *J. Microbiol.*, 2011.
- WEDDING, R. T., CANELLAS, P. F. and BLACK, M. K. Slow transients in the activity of the NAD Malic Enzyme from *Crassula*. *Plant Physiol.* Dec, 1981.
- WIERENGA, R. K., MAEVER, M. C. and HOL, W. G. J. Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide-binding proteins. *Biochemistry* 24:1346–1357, 1995.
- WOLFE A. J. The acetate switch. *Microbiol Mol. Biol.* v. 69, n.1, p. 12-50, mar. 2005.
- WYNN J. P., KENDRICK A., RATLEDGE C. Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids.* v. 32, n. 6, p. 605-610, 1997.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. In: STANLEY, G; BURRIS, R. M.; EVANS, M. S. (Ed.). *Biological Nitrogen Fixation*. New York. 943p. 1992.
- ZHANG, Y., R. H. BURRIS, P. W. LUDDEN, G. P. ROBERTS. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* v, 152, p. 195–204, 1997.
- ZHANG, Y., ADAMS, I. P., RATLEDGE, C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology.* v. 153, p. 2013-2015, 2007

ZHANG, Y. et al. Loss of malic enzymes leads to metabolic imbalance and altered levels of trehalose and putrescine in the bacterium *Sinorhizobium miloti*. BMC Microbiology. v. 16, n. 163, 2016.