

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA BRUNA SOLIGO SANCHUKI

DINÂMICA PROTEÔMICA DE *Escherichia coli* EM RESPOSTA À LIMITAÇÃO DE
NITROGÊNIO

CURITIBA

2019

HELOISA BRUNA SOLIGO SANCHUKI

DINÂMICA PROTEÔMICA DE *Escherichia coli* EM RESPOSTA À LIMITAÇÃO DE
NITROGÊNIO

Tese 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 Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano F. Huergo
Co-orientadores: Prof. Dr. Glaucio Valdameri
Dra. Edileusa C. M. Gerhardt

CURITIBA

2019

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

Sanchuki, Heloisa Bruna Soligo
Dinâmica proteômica de *Escherichia coli* em resposta à limitação de
nitrogênio / Heloisa Bruna Soligo Sanchuki. – Curitiba, 2019.
119 p.: il.

Orientador: Luciano F. Huergo
Coorientadores: Glaucio Valdameri e Edileusa C. M. Gerhardt

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

1. Nitrogênio 2. Ribossomos 3. *Escherichia coli* I. Título II. Fernandes
Huergo, Luciano 1978- III. Valdameri, Glaucio, 1984- IV. Gerhardt,
Edileusa Cristina Marques V. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências-
Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.54



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 400010160/3P2

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 tese de Doutorado de **HELOISA BRUNA SOLIGO** intitulada: **DINÂMICA PROTEÔMICA DE *Escherichia coli* EM RESPOSTA À LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO FERNANDES HUERGO, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 19 de Agosto de 2019.

LUCIANO FERNANDES HUERGO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JORGE IULEK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

ROBERTO TADEU RAITTZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho ao meu pai

Joel A. Soligo (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Luciano F. Huergo pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos divididos generosamente durante meu mestrado e doutorado e pela compreensão em diversos momentos dessa jornada.

Aos meus co-orientadores Dra. Edileusa Gerhardt, por estar sempre presente e me auxiliar no que fosse preciso, e Dr. Glaucio Valdameri, pelo auxílio nos ensaios de citometria de fluxo.

Aos Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa por avaliarem meus relatórios e serem inspirações para muitos de nós.

Agradeço aos professores e alunos do grupo NFN, em especial ao pessoal dos laboratórios 271 e 272 pela amizade, discussões, empréstimos e risadas.

A coordenação do programa de Ciências-Bioquímica.

Ao CNPq e Capes pelo suporte financeiro.

Aos técnicos do núcleo de fixação de nitrogênio.

Aos amigos que tornam a vida mais leve no decorrer dessa jornada.

E à minha família, pelo amor, carinho e compreensão de sempre. Ao meu pai Joel A. Soligo (*in memorium*) que foi e para sempre será meu exemplo de luta e determinação. À minha mãe Rosana Buss por todo seu amor. Aos meus irmãos Caio e Fernanda pela parceria. E um agradecimento especial ao meu esposo, Carlos E. Sanchuki, pelo seu amor e por estar incondicionalmente ao meu lado, e ao nosso filho, Eduardo S. Sanchuki, que mesmo tão pequenino já me ensina tanto e me torna mais forte do que eu jamais imaginei que poderia ser.

RESUMO

O nitrogênio é um elemento necessário para a biossíntese de diversas biomoléculas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. Na ausência de nitrogênio, procariotos como *Escherichia coli* cessam imediatamente o crescimento. Amônio é a fonte de nitrogênio de preferência para *E. coli* e confere as maiores taxas de crescimento. Sob condições de limitação de amônio, *E. coli* é capaz de utilizar fontes alternativas de nitrogênio, sendo que esta reprogramação é conduzida através da indução do regulon NtrC. Neste trabalho foi utilizada a técnica de proteômica livre de marcação para determinar a dinâmica da expressão de proteínas de *E. coli* em resposta à privação de nitrogênio, tanto inicialmente (30 min) quanto tardiamente (60 min). A abundância de proteínas e modificações pós-traducionais confirmaram que a ativação do regulon NtrC atua como a primeira linha de defesa da célula contra a falta de nitrogênio. A proteína Rmf (*ribosome modulation factor*) foi induzida logo após a célula ser submetida à privação de amônio, seguido da expressão de outras proteínas que atuam inativando os ribossomos, como Hpf e RaiA, apoiando a hipótese de que a inativação dos ribossomos é um processo importante durante a limitação de nitrogênio. O promotor *rmf* foi estudado e contém um promotor sigma54 além do sítio de ligação sigma70. Os dados proteômicos revelaram que a parada do crescimento devido à falta de nitrogênio se correlaciona com o acúmulo de proteínas envolvidas na condensação do DNA, no catabolismo de RNA e proteína e com hibernação de ribossomo. Coletivamente, essas adaptações proteômicas resultam em células metabolicamente inativas que possivelmente exibem tolerância a múltiplas drogas.

Palavras chave: nitrogênio, Ntr, ribossomo, pII, Rmf.

ABSTRACT

Nitrogen is needed for the biosynthesis of biomolecules including proteins and nucleic acids. In the absence of fixed nitrogen, prokaryotes such as *E. coli* immediately ceases growth. Ammonium is the preferred nitrogen source for *E. coli* supporting the fastest growth rates. Under conditions of ammonium limitation, *E. coli* can use alternative nitrogen sources and this reprogramming is orchestrated by the induction of the NtrC regulon. We use label free proteomics to determine the dynamics of *E. coli* proteins expression in response to nitrogen starvation after both short (30 min) and long (60 min) term. Protein abundances and post-translational modifications confirmed that activation of the NtrC regulon acts as the first line of defense against nitrogen starvation. The ribosome inactivating protein Rmf was induced shortly after ammonium exhaustion and this was followed by induction of other ribosome inactivating proteins such as Hpf and RaiA. These data support the hypothesis that ribosome shut-down is a key process during nitrogen limitation stress. The *rmf* promoter was studied and it contains a sigma54 promoter in addition to the sigma70 binding site. The proteomic data revealed that growth arrest due to nitrogen starvation correlates with the accumulation of proteins involved in DNA condensation, RNA and protein catabolism and ribosome hibernation. Collectively, these proteome adaptations will result in metabolic inactive cells which are likely to exhibit multidrug tolerance.

Key words: nitrogen, Ntr, ribosome, pII, Rmf.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A via GS/GOGAT.....	19
Figura 2. Síntese de ppGpp dependente de RelA durante a privação por aminoácidos.	23
Figura 3. Micrografia eletrônica do ribossomo 90S.	25
Figura 4. Mapa do plasmídeo pUA66.....	36
Figura 5. Recombinação sítio específica mediada pela FLP recombinase para excisão do cassete de canamicina.....	44
Figura 6. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> em meio mínimo M9.....	46
Figura 7. Controle do sistema Ntr pelas proteínas PII.	48
Figura 8. Comparação da intensidade normalizada dos peptídeos modificados de GlnB, GlnK e GS na condição -NT1 comparado com +N.	50
Figura 9. Visão geral da adaptação inicial (-NT1) do proteoma de <i>E. coli</i> em resposta à limitação de nitrogênio.	50
Figura 10. Comparação da intensidade normalizada dos peptídeos modificados de GlnB, GlnK e GS na condição -NT2 comparado com +N.	52
Figura 11. Distribuição funcional das proteínas induzidas em resposta à limitação de nitrogênio (-NT2).....	53
Figura 12. Visão geral da adaptação proteômica de <i>E. coli</i> em resposta à privação de nitrogênio prolongada (-NT2).	55
Figura 13. Distribuição funcional das proteínas menos abundantes em -NT2.	57
Figura 14. Expressão das fusões transcricionais promotor: <i>gfp</i> em resposta à privação de nitrogênio.	61
Figura 15. Expressão da fusão transcricional <i>relBE:gfp</i>	62
Figura 16. Expressão da fusão transcricional promotor: <i>gfp</i>	63
Figura 17. O promotor <i>rmf</i>	64
Figura 18. Comparações do sítio consenso de ligação das proteínas NtrC e sigma54 na região promotora do gene <i>rmf</i>	65
Figura 19. Características regulatórias da região <i>rmf</i>	66
Figura 20. Eletroforese dos produtos de PCR das regiões promotoras dos genes <i>rmf</i> e <i>glnK</i>	68
Figura 21. Avaliação da concentração ideal de DNA para uso no ensaio de EMSA.	68
Figura 22. Purificação do fator Sigma54 de <i>E. coli</i>	69

Figura 23. Purificação da proteína NtrC de <i>E. coli</i>	70
Figura 24. Ensaio de ligação da proteína Sigma54 à região promotora do gene <i>rmf</i>	71
Figura 25. Ensaio de ligação da proteína NtrC-P à região promotora do gene <i>rmf</i>	71
Figura 26. Retirada do cassete de Canamicina dos mutantes Keio através da FLP recombinase.	73
Figura 27. Confirmação da deleção do cassete de Canamicina do mutante <i>rpoN</i> por PCR.	73
Figura 28. Ensaio de citometria de fluxo do promotor <i>rmf:gfp</i> com as estirpes de <i>E. coli</i> selvagem e mutantes.....	74
Figura 29. Expressão da fusão transcricional promotor <i>rmf:gfp</i> na presença de NtrBC de <i>A. brasilense</i>	75
Figura 30. Hipótese de regulação do promotor <i>rmf</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes de bactérias e plasmídeos	31
Tabela 2. Proteínas induzidas após 30 minutos em privação de nitrogênio (resposta inicial).....	47
Tabela 3. Proteínas que podem ajudar a promover um estado de dormência em E. coli em resposta à privação de nitrogênio prolongada.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2-OG	=	2-oxoglutarato
Amp ^R	=	resistência a ampicilina
ATase	=	enzima adenililtransferase
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
Cm ^R	=	resistência a cloranfenicol
DO _{600nm}	=	densidade óptica a 600 nanômetros
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
dNTP	=	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
EDTA	=	ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	=	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
GDH	=	glutamato desidrogenase
GlnB-UMP	=	GlnB uridililada
GlnK-UMP	=	GlnK uridililada
GOGAT	=	Glutamato sintase
GS	=	Glutamina sintetase
GS-AMP	=	GS adenilada
IPTG	=	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Km ^R	=	resistência a canamicina
mRNA	=	RNA mensageiro
MS	=	espectrometria de massa
LC-MS/MS massas sequencial	=	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
NtrC-P	=	NtrC fosforilada
pb	=	pares de bases
PCR	=	reação em cadeia da polimerase
ppGpp	=	guanosina 5'-difosfato,3'-difosfato (guanosina tetrafosfato)
UMP	=	5' monofosfato de uracila
UTase	=	enzima uridililtransferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 METABOLISMO DO NITROGÊNIO	18
2.2 FASE ESTACIONÁRIA	21
2.3 PROTEÍNA RMF (Ribosome modulation factor)	24
2.4 PROTEÔMICA	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	31
4.2 MEIOS DE CULTURA	32
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	32
4.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	33
4.4.1 Preparo das células	33
4.4.2 Eletroporação	34
4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	34
4.5.1 Preparo das células	34
4.5.2 Choque térmico	34
4.6 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR	35
4.7 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pHSP _{rmf} E pHSP _{glnK}	35
4.8 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO	36
4.9 ELETROFORESE DE DNA	37
4.10 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES	37
4.11 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS	37

4.12 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SIGMA54-HIS	38
4.13 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NTRC-HIS	38
4.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	39
4.15 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA QUANTITATIVA SEM MARCAÇÃO LC-MS/MS	39
4.16 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FUSÕES PROMOTOR: <i>gfp</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
4.17 ENSAIO DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA	42
4.18 RECOMBINAÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA MEDIADA PELA FLP RECOMBINASE PARA RETIRADA DE CASSETE DE CANAMICINA	43
4.19 ENSAIOS COM AS ESTIRPES DE <i>E. coli</i> MUTANTES UTILIZANDO-SE AS FUSÕES TRANSCRICIONAIS PROMOTOR: <i>gfp</i>	44
5 RESULTADOS	45
5.1 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ACUMULADAS NO PROTEOMA	46
5.1.1 Adaptação proteômica inicial em resposta à limitação de nitrogênio (-NT1)	46
5.1.2 Adaptação proteômica tardia em resposta a privação de nitrogênio (-NT2)	52
5.1.3 Outras proteínas regulatórias com acúmulo alterado	58
5.2 EFEITO DA PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DAS FUSÕES TRANSCRICIONAIS PROMOTOR: <i>gfp</i>	59
5.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>rmf</i> ..	64
5.3.1 Análise de bioinformática do promotor do gene <i>rmf</i>	64
5.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de ligação entre as proteínas Sigma54 ou NtrC e a região promotora do gene <i>rmf</i> de <i>E. coli</i> (<i>Electrophoretic mobility shift assay - EMSA</i>) ..	67
5.3.3 Ensaio <i>in vivo</i> utilizando a fusão promotor <i>rmf:gfp</i>	72
6 DISCUSSÃO	76

7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* tem sido utilizada como organismo modelo desde a descoberta da conjugação por Joshua Lederberg em 1946 (LEDERBERG e TATUM, 1946). Ela é o único modelo que possui evidências bioquímicas e genéticas que descrevem as funções de cerca de 75% dos seus genes, tornando-se o organismo mais bem compreendido até o momento (Riley *et al.*, 2006). O entendimento da regulação do metabolismo do nitrogênio em *E. coli* pode ser aplicado a organismos que possuem sistemas homólogos. Um exemplo é a bactéria *Azospirillum brasilense*, que possui grande potencial como biofertilizante devido sua capacidade de colonizar raízes de plantas e de fixar nitrogênio de forma eficiente (Merrick e Edwards, 1995; PEDROSA, 1987). Além de *A. brasilense*, várias bactérias possuem homologia dos sistemas de regulação do metabolismo de nitrogênio com o de *E. coli*, tais como *Haemophilus influenza*, *Bacillus subtilis* e *Azotobacter vinelandii* (Merrick e Edwards, 1995).

Apesar do amplo conhecimento sobre a regulação do metabolismo de nitrogênio, devido à alta complexidade deste sistema, é muito provável que existam novos fatores e interações metabólicas ainda não conhecidos. Desta forma, uma abordagem ampla como a proteômica torna-se uma ferramenta importante, pois possibilita avaliar de forma global os níveis de expressão proteica sob uma determinada condição ambiental (Han e Lee, 2006).

Com base no exposto, o objetivo principal deste projeto foi determinar a dinâmica proteômica de *E. coli* em condições de alta e baixa concentração de nitrogênio, assim como o efeito da privação deste elemento em função do tempo.

Este trabalho foi dividido em três partes principais, sendo que na primeira o foco foi a discussão dos resultados da análise proteômica de *E. coli* na condição de abundância e de limitação de nitrogênio. O foco da segunda foi a avaliação do efeito da privação de nitrogênio na atividade dos promotores de alguns genes por meio de fusões transcricionais promotor:*gfp*. Por fim, na terceira parte, apresentamos os ensaios *in vitro* e *in vivo* com o promotor do gene *rmf*, selecionado devido à proteína Rmf ter sido encontrada diferencialmente expressa no proteoma, sua extrema importância para controlar a atividade dos ribossomos, e a de não haver trabalhos

relacionando o controle de sua expressão com a regulação do metabolismo do nitrogênio.

Os resultados de proteoma e de expressão de genes em resposta à privação de nitrogênio obtidos neste projeto foram compilados no artigo intitulado "*Dynamics of the Escherichia coli proteome in response to nitrogen starvation and entry into the stationary phase*" publicado na revista Biochimica et Biophysica Acta: protein and proteomics.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento essencial para a síntese da maioria das macromoléculas da célula bacteriana (incluindo ácidos nucleicos, proteínas e componentes da parede celular). Os microrganismos são capazes de utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados como fonte de nitrogênio, sendo que amônio é a de preferência para várias bactérias, e, quando presente, suprime a utilização de outras fontes (Merrick e Edwards, 1995).

Existem duas vias principais de assimilação de amônio por microrganismos, a via envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GDH), que é codificada pelo gene *gdhA*, e a via da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), codificada pelos genes *gltBD* respectivamente. Em *E. coli*, a assimilação de amônio se dá majoritariamente pela via GS/GOGAT onde a GS converte glutamato e amônio em glutamina com o gasto de 1 ATP para cada amônio assimilado, e, em sequência, a GOGAT transfere o grupamento amina da glutamina para o 2-oxoglutarato (2-OG), produzindo duas moléculas de glutamato (figura 1). Portanto, os produtos da assimilação do amônio são glutamato e glutamina, conhecidos por serem os principais doadores de nitrogênio na célula (Reitzer, 2003). O estado de nitrogênio em *E. coli* é refletido pelos níveis de glutamina e 2-OG, de tal forma que quando há baixa concentração de amônio, os níveis de glutamina também são baixos e os de 2-OG são altos (Huergo e Dixon, 2015; Reitzer, 2003; Yuan *et al.*, 2009).

Para evitar gasto desnecessário de energia é importante que as vias de utilização de nitrogênio sejam reguladas. O sistema que regula o metabolismo do nitrogênio é denominado Ntr e em *E. coli* é composto por um conjunto de 7 proteínas: NtrB, NtrC, GlnD (UTase/UR), GlnB (PII), GlnK (PII), ATase e GS. (Merrick e Edwards, 1995). Este sistema é estimulado quando amônio está indisponível, ativando a transcrição de genes relacionados à utilização de fontes alternativas de nitrogênio, como nitrato e aminoácidos (Merrick e Edwards, 1995).

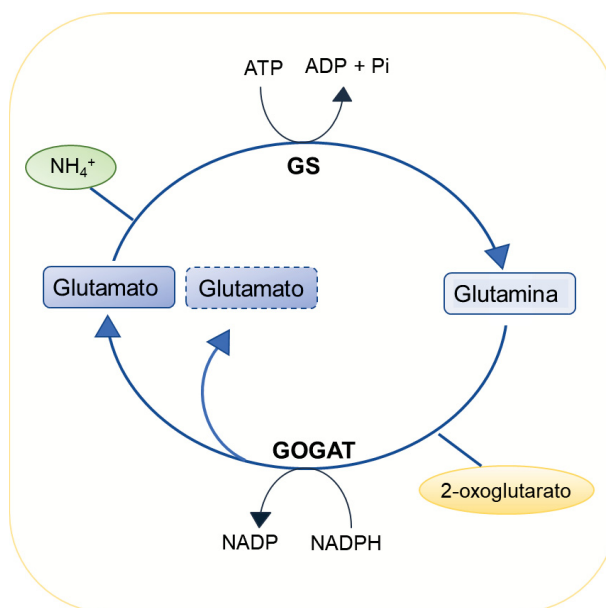


Figura 1. A via GS/GOGAT. Esta via compreende duas enzimas, a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT), produzindo um glutamato para cada aminação redutiva do 2-oxoglutarato. Fonte: adaptado de (Heeswijk, van, Westerhoff e Boogerd, 2013).

As proteínas da família PII desempenham um papel central na coordenação das vias do metabolismo de nitrogênio. Elas são amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em Bacteria, Archea e em cloroplastos de algas e plantas (Arcondéguy, Jack e Merrick, 2001; Huergo *et al.*, 2013). As PII mais estudadas são as de *E. coli*, sendo essas denominadas GlnB e GlnK. A proteína GlnB é expressa constitutivamente enquanto GlnK é regulada por NtrC (Heeswijk, Van *et al.*, 1996).

Proteínas PII são capazes de interagir com suas proteínas alvos em função da ligação dos efetores ATP, ADP e 2-OG, e são capazes de sensoriar o estado de nitrogênio celular devido sua capacidade de ligar este último (Leigh e Dodsworth, 2007). As proteínas alvos de PII conhecidas em *E. coli* são: o transportador de amônio AmtB, a enzima Acetil-CoA carboxilase, a enzima ATase e a proteína sensora NtrB (Javelle *et al.*, 2004; Jiang, Mayo e Ninfa, 2007; Jiang e Ninfa, 1999a; Rodrigues *et al.*, 2014).

Além de serem reguladas pelos efetores descritos acima, as PII também são reguladas a nível pós-traducional, sendo que em proteobactérias elas são uridililadas pela enzima bifuncional GlnD. GlnD é capaz de sensoriar os níveis de glutamina, sendo que quando este está baixo (situação de limitação de nitrogênio) sua atividade

uridililtransferase é estimulada, catalisando a adição de um grupamento uridilil (UMP) à GlnB e GlnK. Já em situação de alta glutamina (alto nitrogênio), a glutamina se liga à proteína GlnD estimulando sua atividade removedora de UMP e, como consequência, GlnB-UMP e GlnK-UMP são desuridilidadas (Bloom *et al.*, 1978; Peng Jiang, James A. Peliska e Ninfa, 1998).

O estado de uridililação das proteínas PII é importante para o seu efeito sobre a atividade da enzima ATase. A ATase regula a atividade da proteína GS através de modificação pós-traducional (adenilação/desadenilação). Em alto nitrogênio, PII desuridililadas interagem com a ATase estimulando a inativação da GS por adenilação. Já em condição de limitação de nitrogênio, GlnB-UMP e GlnK-UMP interagem com ATase promovendo a desadenilação e ativação da GS (Brown, Segal e Stadtman, 1971; Ninfa e Jiang, 2005).

Proteínas PII também estão relacionadas à regulação do sistema NtrB/NtrC. Em baixo nitrogênio, GlnB-UMP e GlnK-UMP não são capazes de interagir com NtrB. Sendo assim, NtrB é capaz de promover a fosforilação de NtrC que irá ativar a transcrição de genes envolvidos principalmente na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio (Atkinson *et al.*, 1994). Em 2000, Zimmer e colaboradores mostraram através da técnica de microarranjo que 2% do genoma de *E. coli* parece estar sob o controle de NtrC em conjunto com a Holoenzima RNA polimerase sigma54 (σ^{54}). As subunidades σ da RNA polimerase são responsáveis pelo reconhecimento de regiões específicas do DNA e, portanto, são determinantes na expressão diferencial de genes (Helmann e Chamberlin, 1988). A proteína NtrC-P atua como ativadora da transcrição de promotores σ^{54} através da conversão do complexo fechado formado pela Holoenzima RNA polimerase σ^{54} em um complexo aberto funcional (Su *et al.*, 1990).

Através da técnica de *ChiP-seq*, foi descoberto que NtrC regula a transcrição do gene *relA* em *E. coli* (Brown *et al.*, 2014). Este gene codifica para a enzima ppGpp sintetase (RelA) que catalisa a síntese da molécula sinalizadora guanosina tetrafosfato (ppGpp). Em condição de estresse, como em situação de limitação de aminoácidos que causa a entrada do cultivo em fase estacionária, ppGpp tem sua síntese aumentada por RelA levando a uma mudança global no metabolismo conhecida como resposta estrigente (Chatterji e Kumar Ojha, 2001). As ações de ppGpp sob o metabolismo são diversas, dentre elas, ele é capaz de regular a

transcrição (através da alteração da afinidade da RNA polimerase por diferentes fatores sigma), promover a inibição da biossíntese de proteínas e da replicação do DNA, dentre outras (Carneiro *et al.*, 2011). Durante o estado de limitação de nitrogênio, *E. coli* usa NtrC para integrar a busca por fontes alternativas de nitrogênio com as mudanças mediadas pela resposta estringente, para capacitar a célula a se adaptar à baixa disponibilidade deste nutriente (Brown *et al.*, 2014).

2.2 FASE ESTACIONÁRIA

O crescimento bacteriano em um meio de cultura é devido ao processo de divisão sequencial das células. Estudos em *E. coli* apontam que sua curva de crescimento consiste de cinco fases: fase lag, fase logarítmica, fase estacionária, fase de morte celular e fase estacionária de longo prazo (Finkel, 2006).

Uma vez que os nutrientes do meio sejam exauridos ou que alguma outra condição adversa esteja presente, a cultura bacteriana entra na fase estacionária. Esta fase é caracterizada pelo equilíbrio entre o número de células que estão se dividindo e o número de células que estão morrendo e representa um platô na curva de crescimento. O nome “fase estacionária” está diretamente ligado ao equilíbrio entre divisão e morte e não ao mecanismo de defesa que ocorre durante esta fase (Pletnev *et al.*, 2015).

Um dos mecanismos de defesa utilizados pelas bactérias na fase estacionária é a regulação da transcrição de genes, expressando aqueles necessários para a sobrevivência sob condições de estresse e privação de nutrientes e suprimindo a transcrição dos que não são necessários para este momento celular. *E. coli* utiliza o fator Sigma38 da RNA polimerase, codificado pelo gene *rpoS*, com este propósito. Ele é o regulador central da transcrição sob condições de estresse e uma análise de expressão gênica apontou que 10% do genoma de *E. coli* está sob seu controle (Weber *et al.*, 2005).

Sigma38 é o fator de transcrição necessário para a transição da fase exponencial para a fase estacionária (Maciag *et al.*, 2011). O Sigma38 é homólogo ao Sigma70, que é o fator sigma responsável pela transcrição de genes essenciais que

atuam na manutenção da célula (Reznikoff *et al.*, 1985). Os fatores sigma38 e sigma70 reconhecem a mesma sequência consenso -10 e -35 a montante da posição +1 do sítio de início de transcrição e o que confere maior especificidade por um ou outro são pequenas mudanças nessas sequências (Feklístov *et al.*, 2014; Gaal *et al.*, 2001).

A expressão de *rpoS* é reprimida pelo regulador ArcA fosforilado (Mika e Hengge, 2005) e pelo complexo cAMP-CRP (Lange e Hengge-Aronis, 1994). Já a molécula sinalizadora ppGpp influencia positivamente a síntese de Sigma38 (Gentry, *et al.*, 1993). Sigma38 é expresso em resposta a mudanças adversas e rapidamente decai sob condições ótimas de crescimento, permitindo que a célula eficientemente mude seu perfil transcricional e volte a usar o fator de transcrição Sigma70 (Pletnev *et al.*, 2015).

A regulação da transcrição na fase estacionária não se dá somente através dos fatores sigma da RNA polimerase. Um conjunto de reguladores de transcrição são expressos a fim de alterar a expressão de certos genes. Um exemplo é o principal regulador da fase estacionária denominado Lrp. Essa proteína pode agir como ativadora ou repressora da transcrição e regula aproximadamente 400 genes em *E. coli*, sendo que 75% desses são expressos na fase estacionária (Tani *et al.*, 2002).

Para sobreviver durante condições de estresse, as bactérias mudam amplamente sua organização. Uma dessas mudanças se dá na topologia do DNA. Durante a fase estacionária o nucleóide bacteriano se torna mais condensado para proteger o DNA de danos. Este mecanismo é realizado em parte pela proteína Dps, que se liga ao DNA de forma inespecífica e o protege de danos contra diferentes formas de estresse, como por exemplo, privação de nutrientes e estresse oxidativo (Almirón *et al.*, 1992; Nair e Finkel, 2004). Outra proteína que atua modificando a topologia do DNA é a IHF. IHF tem especificidade a regiões consenso do DNA e promove sua condensação, que é estabilizada através da interação da carga negativa do DNA com a carga positiva da superfície da proteína. Esta proteína é responsável pela organização do nucleóide no início da fase estacionária (Luijsterburg *et al.*, 2006).

Um importante mecanismo celular ativado na fase estacionária é a resposta estrigente mediada pelo regulador central ppGpp. A síntese de ppGpp é feita por duas proteínas com funções similares, as proteínas RelA e SpoT. RelA (ou ppGpp

sintase I) apenas sintetiza ppGpp enquanto SpoT possui dupla atividade catalítica; de síntese de ppGpp (ppGpp sintase II) e de degradação (ppgpp hidrolase) (Navarro Llorens, Tormo e Martínez-García, 2010). As atividades de RelA e SpoT são reguladas por mecanismos diferentes. RelA consegue sensoriar o nível de tRNAs deacetilados (vazios) acumulados e isso leva a uma forte ativação da atividade de síntese de ppGpp. Já SpoT sensoria a escassez de carbono, ferro ou ácidos graxos (Hauryliuk *et al.*, 2015).

Em condição de abundância de nitrogênio, RelA é associada ao ribossomo 70S. No caso de privação de aminoácidos, tRNA deacetilados acumulam na célula e são capazes de se ligar ao sítio A do ribossomo, causando sua parada e a dissociação de RelA. Em sua forma livre, RelA é capaz de catalisar a transferência de pirofosfato do ATP ou GTP para GDP (figura 2) (English *et al.*, 2011).

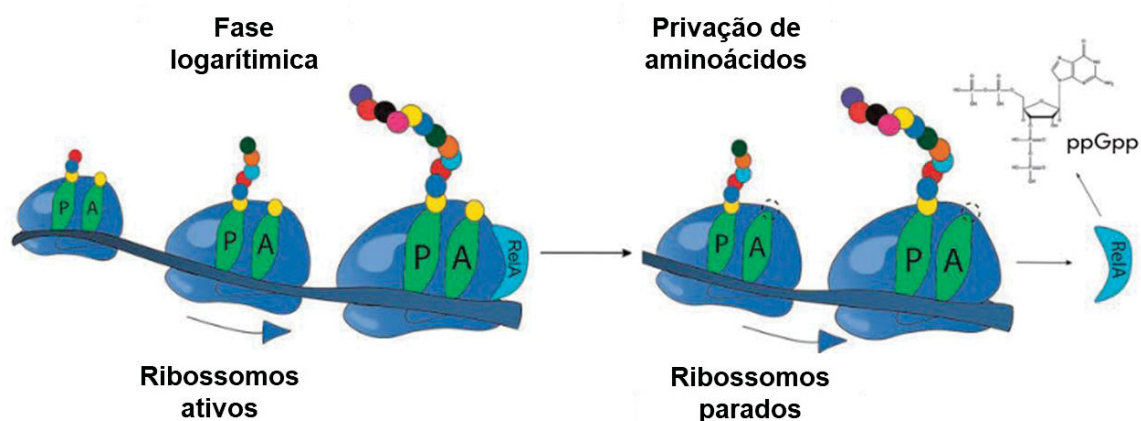


Figura 2. Síntese de ppGpp dependente de RelA durante a privação por aminoácidos. Quando ocorre a ligação de tRNA deacetilado ao sítio A do ribossomo, ocorre a dissociação de RelA e a produção de ppGpp. Fonte: adaptado de (Pletnev *et al.*, 2015)

Este sistema regulatório no qual ppGpp é a peça central é capaz de inibir a replicação do DNA, inibir a tradução de proteínas, regular a transcrição (podendo alterar a expressão de diversos genes bem como a afinidade de RNA polimerase por diferentes fatores sigma) e a atividade de diversas enzimas em resposta ao estresse (Brown *et al.*, 2014; Cashel e Kalbacher, 1970; Hauryliuk *et al.*, 2015). Além disso, ppGpp é capaz de se ligar à RelA, regulando-a positivamente, levando ao aumento da síntese de ppGpp (Hauryliuk *et al.*, 2015).

Análises por ChiP-seq em *E. coli* indicaram que NtrC (regulador da resposta a estresse de nitrogênio) ativa a transcrição de *relA* a partir de um promotor sigma54 em células com privação de nitrogênio (Brown *et al.*, 2014). Desta forma, a resposta clássica de privação de nitrogênio foi conectada com outras vias metabólicas.

A síntese de ribossomos é um processo que despende muita energia da célula. Mesmo na fase estacionária, onde ocorre a diminuição de tradução, os ribossomos são preservados para poderem retornar à atividade quando a condição do meio voltar a ser favorável. Este processo chamado de hibernação é ativado pela resposta estrigente, uma vez que ppGpp regula a síntese de várias proteínas responsáveis pela hibernação do ribossomo, como por exemplo, a Rmf (English *et al.*, 2011; Izutsu, Wada e Wada, 2001). O processo que regula a tradução na fase estacionária é altamente dependente do grau de privação de nutrientes e do tempo em que a célula se encontra nesta situação (Pletnev *et al.*, 2015).

2.3 PROTEÍNA RMF (Ribosome modulation factor)

A proteína Rmf foi descoberta por Wada e colaboradores em 1990 durante um estudo que analisava proteínas capazes de se ligar ao ribossomo através de gel de eletroforese bidimensional (Wada *et al.*, 1990). Ela é uma proteína pequena (composta por 55 aminoácidos) que possui massa molecular de 6,5 kDa (Wada *et al.*, 1990) e é encontrada em algumas gammaproteobactérias, incluindo *E. coli* (Yoshida e Wada, 2014).

A Rmf é capaz de se ligar ao ribossomo e convertê-lo em um dímero inativo 90S incapaz de traduzir proteínas (Wada *et al.*, 1995). Os ribossomos são ribonucleoproteínas universalmente conservadas. Em bactérias são compostas por duas subunidades assimétricas, a subunidade maior (50S) e a menor (30S), que se associam para formar o ribossomo ativo 70S. Em *E. coli* a subunidade 50S é composta por duas espécies de RNA ribossomal (23S e 5S) e 33 proteínas ribossomais (L1 a L36) e a subunidade 30S é formada pelo RNA ribossomal 16S e 21 proteínas ribossomais (S1 a S21) (Kaczanowska e Rydén-Aulin, 2007; Shajani, Sykes e Williamson, 2011).

O ribossomo 90S é formado pela dimerização de dois ribossomos 70S mediada pelo contato entre as subunidades 30S (figura 3) (Yoshida *et al.*, 2002). A ligação da Rmf ocorre na subunidade 50S, próxima às proteínas ribossomais S13, L13 e L2, perto do sítio peptidil-transferase (ou sítio P) do ribossomo (Yoshida *et al.*, 2002), e protege algumas bases do 23S rRNA, incluindo A2451, que está envolvida na atividade de peptidil-transferase (Yoshida *et al.*, 2004).

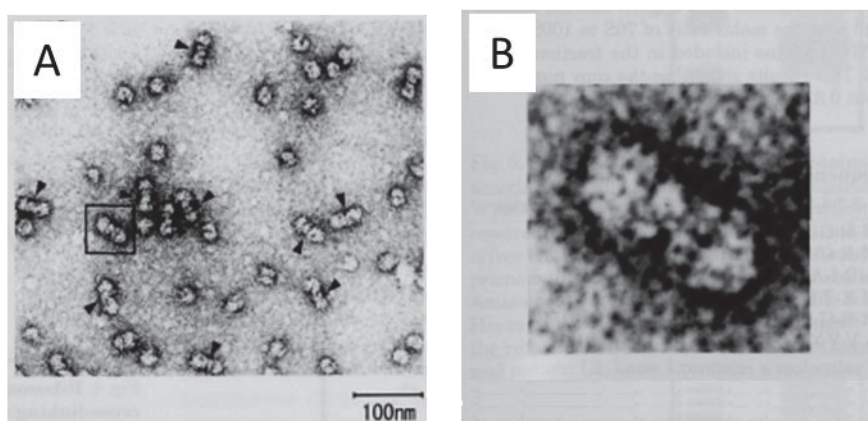


Figura 3. Micrografia eletrônica do ribossomo 90S. A) Os dímeros de ribossomos 90S estão indicados pelas setas. B) Ampliação da região selecionada pelo quadrado mostrando contato entre as subunidades 30S. Fonte: adaptado de (Yoshida *et al.*, 2002).

Outras proteínas acessórias como YhbH (ou Hpf – *hibernation promoting factor*) (Maki, Yoshida e Wada, 2000; Ueta *et al.*, 2008) e YfiA (ou RaiA) (Agafonov *et al.*, 1999; Agafonov, Kolb e Spirin, 2001; Maki, Yoshida e Wada, 2000) participam juntamente com a Rmf na modificação funcional e estrutural dos ribossomos.

Essas proteínas de modulação do ribossomo são induzidas sob condição de privação de nutrientes (Ishihama, 1999; Maki, Yoshida e Wada, 2000; Wada *et al.*, 1990, 1995; Yamagishi *et al.*, 1993). A célula mutante *rmf* apresenta menor viabilidade durante a fase estacionária e não apresenta dímeros de ribossomos, indicando o papel fundamental da Rmf no armazenamento de ribossomos durante a condição de privação de nutrientes (Yamagishi *et al.*, 1993).

A indução de expressão de genes em condições de estresse geralmente está sob o controle de fatores de transcrição que monitoram condições ambientais específicas. Entretanto, ainda pouco se sabe sob a regulação do gene *rmf*. Um estudo revelou que a transcrição do gene *rmf* está sob o controle de ppGpp (Izutsu, Wada e

Wada, 2001), o regulador central da resposta estrigente que é induzido sob condição de privação de aminoácidos (Hauryliuk *et al.*, 2015).

Shimada e colaboradores em 2011 descobriram através de um estudo que visava a identificação de alvos de cAMP e CRP que o complexo cAMP-CRP está envolvido na regulação do gene *rmf* (Shimada *et al.*, 2011). Mais tarde, no ano de 2013, eles analisaram mais detalhadamente esta regulação e observaram por ensaio de retardamento da migração do DNA em gel que a ligação de CRP ao promotor *rmf* é dependente da ligação de cAMP. Eles também realizaram um ensaio de dimerização de ribossomo *in vivo* e observaram que cAMP-CRP estimula a formação dos dímeros 90S (Izutsu, Wada e Wada, 2001; Shimada, Yoshida e Ishihama, 2013).

Como a regulação do promotor *rmf* ainda é pouco conhecida, Yoshida e colaboradores visaram identificar fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação do gene *rmf* (Yoshida, Shimada e Ishihama, 2018). Depois de vários ensaios, eles selecionaram 5 fatores de transcrição capazes de regular a atividade de *rmf* que estão envolvidos com a resposta ao estresse. Os resultados indicaram que *rmf* é regulado negativamente por ArcA e ativado por McbR, RcdA, SdiA e SlyA. Durante esses ensaios, eles avaliaram a capacidade de NtrC (principal regulador do metabolismo de nitrogênio) e Crp (regulador central do metabolismo de carbono) de se ligarem à região promotora *rmf*. Embora esses dois fatores tenham se ligado à região promotora *rmf*, eles se ligaram também ao controle negativo do ensaio (Yoshida, Shimada e Ishihama, 2018). Dessa forma, ainda fica elusiva a ligação do gene *rmf* com o metabolismo do nitrogênio.

A expressão de *rmf* também pode ser regulada a nível pós-transcricional através da ação de poliaminas (Terui *et al.*, 2010). Poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são moléculas de natureza policatiônica que se associam com ácidos nucleicos e são normalmente encontradas como complexo RNA-poliamina na célula (Igarashi e Kashiwagi, 2010). Elas são amplamente distribuídas na natureza e necessárias para o crescimento celular, desde células bacterianas até de mamíferos (Igarashi e Kashiwagi, 2010). As poliaminas se associam com o mRNA *rmf* causando uma mudança conformacional no RNA que estimula a tradução de Rmf (Terui *et al.*, 2010).

Embora muitos dos genes expressos na fase estacionária estejam sob o controle do fator sigma38 da RNA polimerase, a expressão de *rmf* é independente desse fator (Yamagishi *et al.*, 1993). O gene *rmf* possui um promotor sigma70 fraco (Yamagishi *et al.*, 1993) e análise por bioinformática (Reitzer e Schneider, 2001) e ChiP-seq (Bonocora *et al.*, 2015) revelaram que *rmf* possui um provável promotor sigma54. Dessa forma, um estudo mais detalhado do promotor e gene *rmf* pode levar a uma melhor compreensão dos fatores ainda não elucidados envolvidos na regulação desse gene e de sua relação com o metabolismo do nitrogênio.

2.4 PROTEÔMICA

Proteômica pode ser definida como o estudo em larga escala de proteínas. Através desta técnica, várias proteínas podem ser analisadas simultaneamente e um dos seus focos é a quantificação de proteínas comparando-se diferentes grupos ou estados biológicos (Pandey e Mann, 2000).

Os experimentos de proteômica podem ser utilizados para anotação e correção da sequência genômica, quantificação da abundância de proteínas, detecção de modificações pós-traducionais e identificação de interação proteína-proteína (Aebersold e Mann, 2003). Desta forma, a proteômica pode ser um complemento importante para as técnicas de genômica e transcriptômica. Por exemplo, embora seja possível monitorar os níveis de abundância de mRNA em diferentes estados biológicos, essa abundância não necessariamente corresponde aos níveis de proteína, uma vez que elas podem ser reguladas a nível de tradução e degradação. Além disso, a atividade das proteínas podem ser precisamente reguladas por modificações pós-traducionais (Cox e Mann, 2007).

Nos últimos anos, as ferramentas utilizadas para realizar análises de proteômica, especialmente a espectrometria de massas (MS), avançaram muito em instrumentação, preparação de amostras e análise de dados. Atualmente é possível a identificação de virtualmente todas as proteínas expressas em um único experimento (Altelaar, Munoz e Heck, 2013).

Análise *bottom-up* se refere a caracterização de proteínas através da análise dos peptídeos liberados pela digestão com proteases (comumente tripsina). Quando essa análise é feita com uma mistura de proteínas ela é chamada de proteômica *shotgun* (Wolters, Washburn e Yates, 2001). Normalmente, essa mistura de peptídeos é fracionada e submetida a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). A identificação dos peptídeos é feita através da comparação do espectro de massa derivado da fragmentação do peptídeo com um espectro de massa teórico gerado pela digestão da proteína *in silico* (Wolters, Washburn e Yates, 2001). Outra estratégia que pode ser utilizada é do tipo *top-down*. Nela não é realizada a digestão das proteínas, ou seja, elas são identificadas intactas. Esta técnica tem algumas vantagens na análise de modificações pós-traducionais e isoformas. Entretanto, ainda existem algumas limitações como dificuldades no fracionamento, ionização e fragmentação das proteínas na fase gasosa. Sendo assim, a proteômica *shotgun* ainda é a mais utilizada na análise de proteínas e suas modificações (Zhang *et al.*, 2013).

Atualmente é possível que a mistura de proteínas proveniente da digestão com proteases seja diretamente injetada no cromatógrafo líquido (que fica acoplado ao espectrômetro de massas), onde ocorrerá a separação dos peptídeos por fase reversa. Em seguida, os peptídeos são analisados diretamente no espectrômetro através de ionização por eletrospray (ESI) ou ionização a laser assistida por matriz (MALDI). Primeiramente, ocorre a determinação da massa do peptídeo e em seguida os íons de peptídeos são fragmentados na fase gasosa para produzir informação sobre sua sequência e modificações (Chait, 2006).

A identificação de peptídeos é uma parte fundamental no processamento de dados exigida pela espectrometria de massa. Existem várias estratégias que auxiliam na interpretação dos dados de MS/MS, dentre elas, a técnica *de novo* (que utiliza apenas os dados dos espectros MS/MS) e a técnica que confronta as sequências obtidas com o banco de dados (similar à anterior, porém, o algoritmo não usa os espectros coletados anteriormente e sim o conhecimento do padrão de fragmentação de peptídeos e simula espectros baseado em banco de dados) (Pomastowski e Buszewski, 2014). Diversos programas são capazes de realizar essa etapa de processamento, dentre eles o software Andromeda (Cox *et al.*, 2011).

Um dos focos da proteômica tem sido a análise quantitativa de proteínas com a finalidade de comparar diferentes grupos de amostras. Por exemplo, pode-se focar na avaliação quantitativa de proteínas de uma cultura bacteriana submetida a diferentes regimes nutricionais com o propósito de determinar mudanças no perfil proteico como resultado desses regimes. Outro exemplo seria a análise quantitativa de proteínas de um organismo selvagem comparado com um mutante a fim de determinar quais mudanças ocorrem na dinâmica proteômica desse organismo devido à presença da mutação.

A espectrometria de massas oferece várias técnicas que podem ser empregadas para quantificar proteínas (Bantscheff *et al.*, 2012). Muitas dessas técnicas utilizam a marcação com isótopos, nos quais os sinais dos peptídeos marcados são diretamente comparados dentro da mesma aquisição de LC-MS/MS. Uma das vantagens da marcação com isótopos é a possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo com diferentes marcações e as desvantagens são variações que ocorrem na reação química de marcação e a incompatibilidade dos marcadores com outros reagentes químicos (Bantscheff *et al.*, 2012).

Outra técnica existente é a quantificação livre de marcação. Essa abordagem também utiliza a diferença relativa da intensidade do sinal de MS entre peptídeos correspondentes. A diferença é que neste caso cada amostra é analisada em corridas de LC-MS/MS individuais e é realizada a sobreposição da intensidade de sinal dos peptídeos para observar modificações quantitativas (Wright *et al.*, 2012).

A proteômica é uma ferramenta valiosa para a biologia de sistemas pois permite uma abordagem ampla melhorando a compreensão de processos biológicos complexos. Com o auxílio desta técnica foi possível avaliar a dinâmica de expressão de proteínas na bactéria *E. coli* em resposta a privação de nitrogênio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

-Determinar a dinâmica proteômica de *E. coli* em resposta à limitação de nitrogênio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise proteômica de *E. coli* em condição de excesso e durante a transição para a condição de ausência de nitrogênio;

- Identificar proteínas e vias metabólicas diferencialmente expressas em resposta à limitação de nitrogênio;

- Utilizar biblioteca de promotores de *E. coli* fusionados transcricionalmente ao gene repórter *gfp* para corroborar os dados de expressão proteica diferencial obtidas no proteoma;

- Analisar a região promotora do gene *rmf* e sua regulação.

4 METODOLOGIA

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Estirpes de bactérias e plasmídeos

Estirpe/plasmídeo	Característica	Referência
<i>E. coli</i>		
MG1655	Estirpe selvagem <i>E. coli</i> K-12 F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1.	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
BW25113	Δ (<i>araDB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>::rrnB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaDB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(Datsenko e Wanner, 2000)
JW3169-1	Derivada estirpe BW25113 Δ <i>rpoN</i> 730:: <i>kan</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW3839-2	Derivada estirpe BW25113 Δ <i>glnG</i> 730:: <i>kan</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
HS01	Derivada estirpe JW3169-1 Δ <i>rpoN</i> 730	Este trabalho
HS02	Derivada estirpe JW3839-2 Δ <i>glnG</i> 730	Este trabalho
DH10B	Sm ^R F'[<i>proAB</i> + <i>lacZ</i> Δ M15]	(Sambrook, <i>et al</i> 1989)
BL21	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ <i>clts</i> 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5</i> -T7 <i>gene</i> 1) Sm ^r , F'[<i>proAB</i> + <i>lacZ</i> Δ M15]	(Sambrook, <i>et al</i> 1989)
Plasmídeo		
puC19a	Amp ^R Vetor de expressão promotor <i>Lac</i>	Invitrogen
pHSP <i>rmf</i>	Amp ^R pUC19 que contem região promotora <i>rmf</i> clonada	Este trabalho
pHSP <i>glnK</i>	Amp ^R . pUC19 que contem região promotora <i>glnK</i> clonada	Este trabalho
JW3169	Cm ^R Promotor T5- <i>lac</i> induzido por IPTG. Expresssa proteína Sigma54 de <i>E. coli</i> com cauda de histidina N-terminal. Coleção ASKA.	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2006)
JW3839	Expresssa proteína NtrC de <i>E. coli</i> com cauda de histidina N-terminal. Coleção ASKA	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2006)
pCP20	Amp ^R Expressa FLP-recombinase. Origem de replicação sensível a temperatura.	(Cherepanov e Wackernagel, 1995)
pLHBCTZ	Amp ^R Expressa NtrBC de <i>Azospirillum brasilense</i> Plasmídeo pTZ18R com promotor <i>lac</i>	(Huergo <i>et al.</i> , 2003)
Coleção		
puA66	Km ^R Repórter <i>gfpmut2</i> . Biblioteca Fusão transcricional <i>promotor::gfp</i> de <i>E. Coli</i>	GE Healthcare. (Zaslaver <i>et al.</i> , 2006)

Fonte: a autora

4.2 MEIOS DE CULTURA

A bactéria *E. coli* foi cultivada nos meios ricos LB (líquido) ou LA (sólido, LB acrescido de 15 g/L de ágar) conforme descrito em Sambrook, *et al* 1989. O meio mínimo utilizado foi o M9 suplementado com 3 ou 30 mM de NH₄Cl (Na₂HPO₄ 45 mM, KH₂PO₄ 17 mM, NaCl 6,8 mM, glucose 0,4%, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 2mM). A utilização dos meios variou conforme o tipo de experimento realizado.

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a análise proteômica as células de *E. coli* MG1655 foram primeiramente cultivadas em meio LB por aproximadamente 8 horas. Em seguida, foi realizado um inóculo de 1:50 (v/v) a partir desse cultivo em meio M9 contendo 3 mM de NH₄Cl como fonte de nitrogênio que foi mantido a 37 °C e 120 rpm por aproximadamente 15 h (durante a noite). Este cultivo foi usado para inocular na razão de 2:50 (v/v) o meio M9 contendo 3 mM de NH₄Cl (-N) ou 30 mM de NH₄Cl (+N). Com essa diluição, o cultivo começa com uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,05. As células foram mantidas a 37 °C sob agitação constante de 120 rpm e DO_{600nm} medida a cada 30 minutos em placa de 96 poços com caminho óptico de 1 cm por aproximadamente 8 horas (até que tenham sido medidos 3 pontos do cultivo -N após entrada na fase estacionária). As células do cultivo -N foram coletadas para análise proteômica após 30 e 60 minutos na fase estacionária (-NT1 e -NT2) e coletadas em uma DO_{600nm} correspondente no cultivo +N. As curvas foram realizadas em triplicata.

A extração de proteínas dessas amostras para a análise proteômica foi realizada da seguinte forma: as amostras coletadas foram mantidas em gelo por 5 minutos, centrifugadas a 3000 g por 15 minutos e os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e KCl 100 mM. As células foram lisadas por sonicação em gelo através de 10 pulsos com intervalo de sonicação de 10 segundos. Após sonicação, o extrato foi submetido a centrifugação de 20000 g a 4°C por 15 minutos. Foi realizada a dosagem de proteínas do sobrenadante pelo método de Bradford e realizadas alíquotas contendo 100 µg de proteínas no extrato. Essas alíquotas foram congeladas, subsquentemente liofilizadas e mantidas a -20°C.

Para os ensaios de avaliação do efeito da privação de nitrogênio na expressão das fusões transcricionais promotor:*gfp* as células de *E. coli* MG1655 foram cultivadas de forma similar ao realizado para a análise proteômica, exceto pelo uso do antibiótico canamicina para manutenção do plasmídeo.

Nos demais ensaios *E. coli* foi cultivada em meio LB a 37 °C sob agitação constante de 120 rpm. As células de *E. coli* foram preservadas em glicerol 50% e estocadas a -20°C.

4.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos empregados e suas respectivas concentrações finais foram: canamicina (Km) 100 µg/mL e Ampicilina (Amp) 250 µg/mL. As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por Sambrook (1989) e conservadas a 4 °C.

4.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

4.4.1 Preparo das células

Colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C sob agitação constante por aproximadamente 16 h. Dois mililitros deste pré-inóculo foram diluídos em 400 mL de meio LB (1:200 v/v) e esta cultura foi incubada a 37 °C sob agitação constante até atingir DO_{600nm} entre 0,4 - 0,6. A cultura foi mantida no gelo por 15 minutos e centrifugada a 1000 g por 20 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com 400 mL de água ultrapura gelada estéril, centrifugadas e suspensas em 40 mL de glicerol 10% gelado estéril. Após nova centrifugação a 2000 g por 10 minutos a 4 °C, o glicerol foi removido por inversão do tubo e as células foram suspensas em 500 µL de glicerol 15% gelado estéril. As células foram aliqüotadas (50 µL) e congeladas a -80°C.

4.4.2 Eletroporação

Para fazer a eletroporação foram misturados aproximadamente 50 ng de plasmídeo ou 1 μ L de ligação com 50 μ L de células eletrocompetentes previamente mantidas em gelo por 10 minutos. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm de distância entre os pólos, previamente esterilizada por luz ultravioleta (UV). As células foram submetidas a um único pulso elétrico de aproximadamente 4 k Ω , 15 kV/cm (tensão elétrica aplicada/distância entre os eletrodos) por 10 milissegundos. Logo após o pulso elétrico foi adicionado 1 mL de meio LB à cubeta. A suspensão de células foi transferida para um tubo estéril e incubada a 37 °C por 45 minutos para recuperação. Alíquotas foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado.

4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

4.5.1 Preparo das células

Algumas colônias de *E. coli* foram cultivadas em 5 mL de meio LB por aproximadamente 16 horas a 37 °C sob agitação constante. Os 2,5 mL do pré-inóculo foram transferidos para 250 mL de meio LB (1:100 v/v) e a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação constante até atingir DO_{600nm} entre 0,3 e 0,4. As culturas foram transferidas para tubos de centrifugação estéreis de 400 mL e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 30 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1 M e mantidas em gelo por 30-60 minutos. As células foram então centrifugadas por mais 10 minutos (sob as mesmas condições) e ressuspensas em 8 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M (a 4 °C) e glicerol 15%. As células foram separadas em alíquotas de 200 μ L e armazenadas a -80°C

4.5.2 Choque térmico

As alíquotas de células quimiocompetentes foram mantidas em gelo por 30 minutos. O DNA de interesse foi adicionado à mistura de células que foi mantida em gelo por mais 15 minutos, seguido de banho a 42 °C por 2 minutos. Após esse choque térmico, as células foram imediatamente transferidas para banho de gelo, ressuspensas em 1 mL de meio LB e mantidas a 37 °C por 40 minutos para recuperação. Alíquotas foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

Para amplificar DNA, foi utilizado o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Kocher, T. D.; Wilson, 1991). Os iniciadores (*primers*) utilizados foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*). O meio reacional foi composto por tampão de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, aproximadamente 20 ng de DNA molde e 1 U de Taq polimerase em 25 µL de volume final de reação. Os parâmetros utilizados para amplificar o DNA foram: desnaturação inicial 96 °C por 2 minutos, desnaturação 94 °C por 30 segundos, anelamento 60 °C por 30 segundos, extensão 72 °C por 1 minuto, extensão final 72°C por 5 minutos e resfriamento à 4°C. Os primers utilizados foram os primers universal e reverso do pUC19a (forward: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' e reverse 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3').

4.7 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pHSP_{rmf} E pHSP_{glnK}

O plasmídeo comercial puA66 contém as regiões promotoras dos genes de *E. coli* fusionados ao gene repórter *gfp* (figura 4) (Zaslaver *et al.*, 2006). Os plasmídeos pUA66 que contêm a região promotora *rmf* (pUA66_{rmf}) e a região promotora *glnK* (pUA66_{glnK}), foram digeridos com as enzimas de restrição XhoI e BamHI e os fragmentos foram ligados ao vetor puC19a digerido com as mesmas enzimas originando os plasmídeos pHSP_{rmf} e pHSP_{glnK}. Os plasmídeos obtidos foram

confirmados como recombinantes por sequenciamento e os primers universal e reverso do pUC19a (forward: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' e reverse 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3') foram utilizados para obter o amplificado da região promotora clonada.

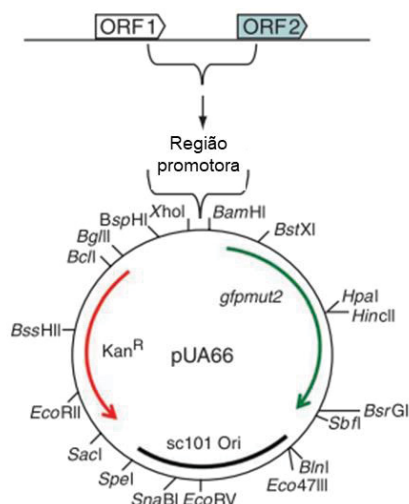


Figura 4. Mapa do plasmídeo pUA66. As enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* foram utilizadas para inserir a região promotora, que é composta pela região intergênica inteira mais 50-60 pares de bases flanqueando as regiões codificantes a montante e a jusante. O plasmídeo confere resistência à canamicina e o gene *gfpmut2* atua como gene repórter (Zaslaver *et al.*, 2006).

4.8 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO

Os plasmídeos foram purificados através da técnica de lise alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989). Células contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas por aproximadamente 16 horas em meio LB contendo antibiótico adequado e depois centrifugadas a 13000 rpm por 30 segundos. O sedimento celular foi ressuspenso em tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8 e 10 mM EDTA pH 8) e a lise celular foi feita pela adição da solução de lise (SDS 1% e 0,2 M NaOH). O DNA cromossomal e proteínas foram precipitadas com a adição de acetato de potássio (3 M pH 4,8). Após incubação em banho de gelo por 10 minutos, as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 100 µL da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 (v/v/v). As amostras foram agitadas em agitador de tubos e centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi coletada e transferida para

um novo tubo. O DNA plasmidial foi precipitado com 2 volumes de etanol 96% e centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. A mistura foi centrifugada por mais 5 minutos, o sobrenadante descartado e o tubo contendo o DNA plasmidial foi mantido em estufa a 37 °C ou dentro da câmara de fluxo laminar para secar. Após seco, o DNA foi ressuspenso em água ultrapura estéril e armazenado a - 20°C. Alternativamente o DNA foi purificado utilizando kits comerciais da Invitrogen.

4.9 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% conforme Sambrook (1989). O DNA foi visualizado após tratamento com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em transluminador de luz ultravioleta e registrado utilizando-se o sistema de imagem acoplado (UVP).

4.10 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES

Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas em gel de poliacrilamida como descrito por LAEMMLI (1970). As soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito por Huergo (2006). As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a 170 V em tampão de corrida por 50-100 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue.

4.11 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

A expressão das proteínas Sigma54 e NtrC de *E. coli* foi realizada em *E. coli* BL21 (λDE3) contendo plasmídeo da coleção ASKA que expressa a proteína de interesse fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal. As células foram cultivadas em 20 mL de meio LB suplementado com o antibiótico

adequado, a 37 °C. Esse pré-inóculo foi então vertido em 400 mL de LB com antibiótico sendo cultivado a 37 °C até DO₆₀₀ 0,5-0,6. Neste momento, foi adicionado IPTG até uma concentração de 0,5 mM e a cultura foi incubada durante 3 horas a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm. Após esse tempo as células foram mantidas em gelo por 30 minutos e depois centrifugadas (5 minutos a 2500 g). As células precipitadas foram transferidas para tubo plástico de 50 mL e congeladas a -20 °C até o momento do uso

4.12 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SIGMA54-HIS

As células contendo a proteína expressa obtida conforme o item 4.11 foram ressuspensas em tampão de sonicação contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + NaCl 100 mM. A suspensão foi sonicada no sonicador Heat System em 15 ciclos de 15 segundos com intervalo de 15 segundos em banho de gelo. O extrato celular proveniente da sonicação foi centrifugado durante 20 minutos a 20000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado em coluna Hi-Trap Chelating pré-carregada com cloreto de níquel e equilibrada com tampão A, que contém Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + NaCl 100 mM. A eluição foi feita com gradiente de imidazol (50, 100, 200, 300 e 500 mM de imidazol, Tris-HCl pH 8,0 e NaCl 100 mM). As frações coletadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE conforme descrito no item 4.10. As frações que continham a maior quantidade da proteína de interesse e maior grau de pureza foram reunidas e dialisadas em tampão Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM e glicerol 50% (v/v). As amostras foram quantificadas, aliquotadas e armazenadas a -80°C.

4.13 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NTRC-HIS

As células contendo a proteína expressa obtida conforme o item 4.11 foram ressuspensas em tampão de sonicação contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + KCl 150 mM. A suspensão foi sonicada no sonicador Heat System em 15 ciclos de 15 segundos com intervalo de 15 segundos em banho de gelo. O extrato celular proveniente da sonicação foi centrifugado durante 20 minutos a 20000 g, a 4 °C. O

sobrenadante foi aplicado em coluna Hi-Trap Chelating pré-carregada com cloreto de níquel e equilibrada com tampão A, que contém Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + KCl 150 mM. A concentração maior de KCl auxilia na solubilidade da proteína. A eluição foi feita com gradiente de imidazol (100, 200, 250 e 400 mM de imidazol, Tris-HCl pH 7,5 e KCl 150 mM). As frações coletadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE conforme descrito no item 4.10. As frações que continham a maior quantidade de proteína de interesse e maior grau de pureza foram reunidas e dialisadas em tampão Tris-HCl pH 7,5, KCl 150 mM e glicerol 20 % (v/v). As amostras foram quantificadas, aliqüotadas e armazenadas a -80 °C.

4.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, *et al.* 1976), segundo recomendações que acompanham o reagente comercial de Bradford da Biorad, usando-se albumina de soro bovino como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, no comprimento de onda de 595 nm.

4.15 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA QUANTITATIVA SEM MARCAÇÃO LC-MS/MS

As amostras liofilizadas provenientes do cultivo de *E. coli* MG1655 em condição de alto e baixo nitrogênio obtidas como descrito no item 4.3, foram enviadas para o Dr. Gustavo A. de Souza – Instituto de Imunologia da Universidade de Oslo, Noruega, com o qual foi firmado uma parceria.

Para a análise de LC/MS/MS, 15 µg de cada amostra foram independentemente suspensas em 50 µL de bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0 e reduzida utilizando-se DTT 1 µM durante 45 minutos. As proteínas foram desnaturadas por aquecimento a 95 °C por 30 minutos, digeridas pela adição de tripsina (Promega) na razão de 1:50 e incubadas a 37 °C em banho seco. A digestão das proteínas foi interrompida com a adição de TFA 3% (v/v). As amostras foram

limpas/concentradas utilizando C18 *STAGE-TIPS* como descrito em (Rappsilber, Ishihama e Mann, 2003) e ressuspensas em 10 μL de ácido fórmico 0,01%. Foram injetados 3 μL de amostra para a corrida. A separação dos peptídeos foi feita em nano-HPLC (EASY Nlc1000, Thermo) usando-se coluna de fase reversa de 25 cm, 75 μm de diâmetro interno e partículas de 2 μm . Os peptídeos foram eluídos após 120 minutos de corrida utilizando-se um gradiente linear de 2 a 30% de solvente orgânico (acetonitrila 100% e ácido fórmico 0,01%) a 300 nL/min.

As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas QExactive Orbitrap (Thermo Scientific). Os parâmetros de aquisição de amostra para MS foram:

MS Scan:

Microscans: 1
Resolution: 70,000 a m/z 200
AGC target: 3e6
Maximum Injection Time: 20 ms
Scan range: 400-1200 m/z

MS/MS data dependent acquisition:

Microscans: 1
Resolution: 17500
AGC target: 1e5
Maximum injection time: 100 ms
Loop Count: 10
Isolation width: 2.0 m/z
Collision energy: 25.0%
Dd settings: Underfill ratio: 0.1%
Charge exclusion: single charge ions
Dynamic exclusion: 30 s

Os dados obtidos no QExactive Orbitrap foram processados no software MaxQuant v1.5.2.8 (Cox e Mann, 2008) usando-se os seguintes parâmetros:

Variable modifications: methionine oxidation
N-acetylation of N-terminal
Conversion of glutamine and glutamate to pyro-glutamate

First search error: 20 ppm
Main search error: 6ppm
Missed cleavages allowed: maximum 2
Protein and peptide FDR: 0.01
Min Unique Peptides: 1
Min Peptide length: 7
Second peptides option: ON
Match between runs: ON
Time window: 2 minutes
Label-free quantification: ON (min ratio count 2)
I-BAQ: ON (log fit ON)

As proteínas foram identificadas usando o banco de dados UNIPROT *E. coli* K-12 de junho de 2014 (4315 entradas). Foram realizadas buscas adicionais de uridililação e adenilação de tirosina.

A análise estatística foi realizada no MaxQuant – pacote Perseus versão 1.5.0.30. Amostras com diferenças estatísticas foram identificadas usando-se o two-way t-test como valor de $p = 0,05$.

4.16 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FUSÕES PROMOTOR:*gfp* POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão dos genes selecionados foi monitorada por citometria de fluxo utilizando os plasmídeos da biblioteca de promotores de *E. coli* fusionados transcricionalmente ao repórter *gfp* (Zaslaver *et al.*, 2006). *E. coli* MG1655 transformada com o plasmídeo contendo a fusão de interesse (figura 4) foi cultivada em triplicata exatamente como descrito para a extração de proteínas para a análise proteômica (item 4.3) (exceto pela presença de canamicina 100 µg/mL para manutenção do plasmídeo). A curva de crescimento foi monitorada através da leitura de DO_{600nm} a cada 30 minutos. As células cultivadas em baixo nitrogênio (-N, 3 mM NH₄Cl) foram coletadas em dois pontos após o cultivo entrar em fase estacionária e todo o amônio ser consumido do meio: 30 minutos (-NT1) e 60 minutos (-NT2). As células cultivadas em alto nitrogênio (+N, 30 mM NH₄Cl) foram coletadas em uma

DO_{600nm} similar ao cultivo -NT1 e -NT2. Foram coletados 300 µL de amostra nos pontos de interesse e as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de TBAC (tampão PBS contendo EDTA 1 mM Tween 20 0,01% (v/v)). As amostras foram mantidas em gelo e analisadas dentro de 3 horas em citômetro de fluxo BD Accuri C5®. Para monitorar a fluorescência de GFP, foram adquiridos 100 mil eventos de cada amostra usando-se o filtro FL1-H (510/15 nm). A calibração do citômetro foi realizada com 8-peack beads (BD Accuri™) conforme orientações do fabricante. Os dados foram expressos como porcentagem da média de fluorescência na condição +N ± desvio padrão. A análise estatística foi feita usando-se o test-t não pareado no software GraphPad Prism 6.0 com $p < 0,05$. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.17 ENSAIO DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA

Os fragmentos de DNA utilizados nas reações foram obtidos através de amplificação por PCR, utilizando-se os plasmídeos pHSP_{Prmf} e pHSP_{glnk} e os oligonucleotídeos iniciadores universal e reverso do plasmídeo pUC19a.

A fosforilação da proteína NtrC foi realizada incubando a proteína NtrC purificada com 10 mM de carbamil-fosfato (Sigma-Aldrich®) em tampão TAP (50 mM de Tris acetato pH 8,0; 100 mM de acetato de sódio; 8 mM de acetato de magnésio; 27 mM de acetato de amônio; 1 mM de ditioneitol e 3,5% PEG) (Popham *et al.*, 1989) a 30°C por 15 min.

A proteína Sigma54 ou NtrC-P e os fragmentos de DNA foram incubados em tampão TAP por 10 minutos a 30°C. Após o período de incubação, foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,001% e glicerol 50%) e aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina) à tensão de 70V por aproximadamente 90 minutos em banho de gelo. O gel foi corado com brometo de etídeo e analisado no sistema de imagem UVP.

4.18 RECOMBINAÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA MEDIADA PELA FLP RECOMBINASE PARA RETIRADA DE CASSETE DE CANAMICINA

As estirpes de *E. coli* com mutação nos genes *rpoN* e *glnG* foram adquiridas da Keio *collection*. Elas possuem a inserção de um cassete de canamicina flanqueado por sítios FRT (*Flp recombinase target*) (Baba *et al.*, 2006). Os ensaios realizados com essas estirpes necessitaram que elas fossem transformadas com um plasmídeo de mesma resistência e, por esse motivo, foi preciso retirar o cassete de canamicina dos mutantes para a célula manter o plasmídeo de interesse. A técnica de escolha para retirada do cassete foi a da FLP recombinase (figura 5).

Primeiramente, os mutantes foram transformados através da técnica de transformação bacteriana por eletroporação (item 4.4) com o plasmídeo pCP20 que expressa a FLP-recombinase. Esse plasmídeo possui resistência à ampicilina e origem de replicação sensível a temperatura. Após a transformação, as células foram recuperadas em meio LB a 30 °C por 1 h. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio LA contendo ampicilina (para selecionar os transformantes) e cultivadas a 30 °C durante a noite. Na sequência, foi feito um inóculo a partir de uma única colônia em 5 mL de meio LB sem antibiótico, que foi crescido a 43 °C sob agitação constante para indução da recombinação. No dia seguinte, foi feita uma diluição de 1:100 dessa cultura em meio LB e realizado o plaqueamento de 50 µL dessa diluição em placas de LA. As placas foram mantidas a 30 °C durante a noite. Após esse período, foram selecionadas 6 colônias individuais que foram plaqueadas em meio LA com canamicina (cultivada a 37 °C), LA com ampicilina (cultivada a 30 °C) e LA sem antibiótico (cultivada a 37 °C), nessa ordem. Foram selecionadas as células que não foram capazes de crescer na presença de canamicina (perda do cassete) e ampicilina (perda do plasmídeo) e que foram capazes de crescer no meio sem antibiótico (célula viável).

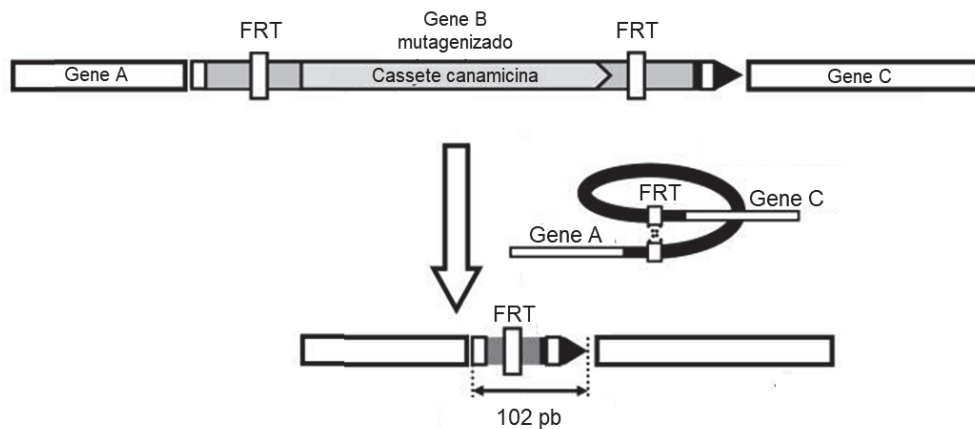


Figura 5. Recombinação sítio específica mediada pela FLP recombinase para excisão do cassette de canamicina. A FLP reconhece os sítios FRT (*FLP recombinase target*) fazendo a retirada do cassette e deixando uma cicatriz de 102 pares de bases. Fonte: adaptado de Baba *et al.*, 2006.

4.19 ENSAIOS COM AS ESTIRPES DE *E. coli* MUTANTES UTILIZANDO-SE AS FUSÕES TRANSCRICIONAIS PROMOTOR:*gfp*

As estirpes de *E. coli* com mutações nos genes *rpoN* e *glnG* foram transformadas através da técnica de choque térmico (item 4.5) com o plasmídeo puA66, que contém a região promotora *rmf* fusionada transcricionalmente ao gene repórter *gfp*. Essas células foram cultivadas nas mesmas condições feitas para a análise do proteoma (exceto pela presença de canamicina 100 µg/mL para manutenção do plasmídeo) e avaliadas por citometria de fluxo para observar o efeito das mutações na expressão da fusão promotor *rmf:gfp*.

5 RESULTADOS

Embora exista um amplo conhecimento sobre a regulação do metabolismo de nitrogênio em *E. coli*, é muito provável que existam outras interrelações metabólicas ainda a serem descobertas principalmente durante o processo de transição de uma condição rica em nitrogênio para uma condição onde nitrogênio é escasso. Estudos de proteoma em condições bem definidas podem fornecer um melhor entendimento de processos biológicos complexos e podem permitir a inferência de funções proteicas ainda desconhecidas.

A fim de determinar como *E. coli* MG1655 adapta seu proteoma em uma situação de estresse causada pela privação da sua fonte de nitrogênio preferencial, as células foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo baixo nitrogênio (3 mM NH₄Cl, -N) ou alto nitrogênio (30 mM NH₄Cl, +N). Foram realizadas curvas de crescimento em triplicata para cada condição através do acompanhamento da DO_{600nm} a cada 30 minutos. As células cultivadas na condição de -N cresceram exponencialmente até atingirem DO_{600nm} de aproximadamente 0,6. Neste ponto, segundo dados da literatura, todo o amônio deve ter sido consumido, implicando na entrada do cultivo em fase estacionária (Brown *et al.*, 2014).

Com o propósito de avaliar as respostas iniciais e tardias de *E. coli* à privação de nitrogênio, optou-se por realizar a coleta de células para a análise proteômica em dois momentos distintos no cultivo -N: 30 minutos após a entrada na fase estacionária (resposta inicial, T1) e 60 minutos após a entrada na fase estacionária (resposta tardia, T2) (figura 6A). As células cultivadas na condição +N não tiveram restrição de crescimento e foram coletadas na fase exponencial em uma DO_{600nm} de 0,6 similar ao cultivo -N (figura 6B).

Após serem coletadas, as células foram preparadas para análise por espectrometria de massa livre de marcação - LC/MS/MS. Com o auxílio desta técnica foi investigado o perfil global de expressão das proteínas na célula e realizadas comparações entre as amostras +N e -NT1 (resposta inicial) e +N e -NT2 (resposta tardia).

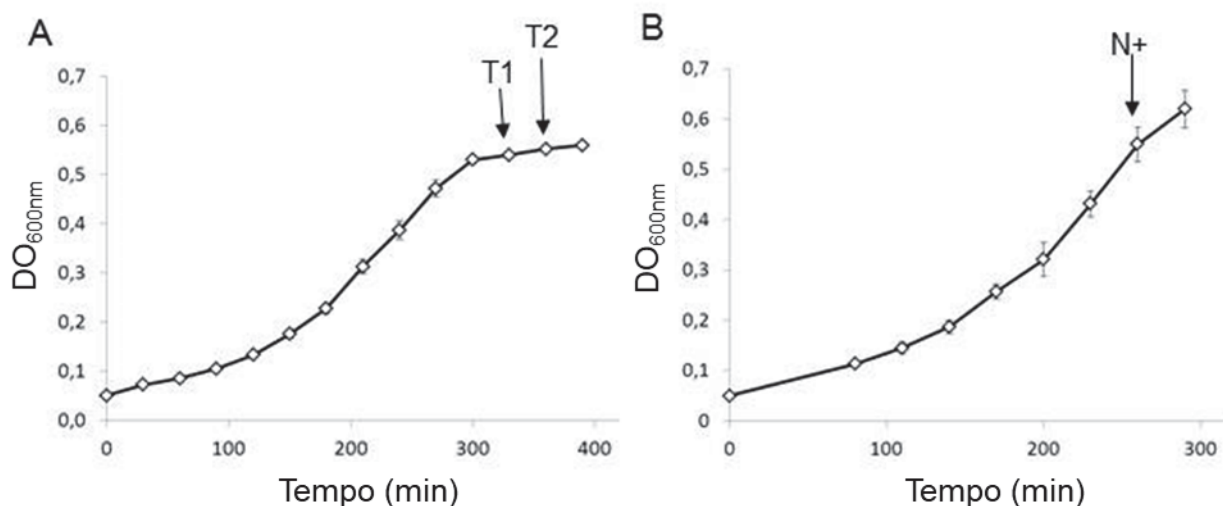


Figura 6. Curva de crescimento de *E. coli* em meio mínimo M9. (A) -N, 3mM NH₄Cl e (B) + N, 30 mM NH₄Cl. As setas indicam o momento em que as amostras foram coletadas para análise por LC/MS/MS. As barras representam o desvio padrão de 3 experimentos independentes. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

Pela análise dos resultados de LC/MS/MS foram identificadas e quantificadas 2103 proteínas. Destas, foram consideradas diferencialmente acumuladas as que tiveram um *fold change* > 2 e *p value* < 0,05 considerando pelo menos 2 peptídeos para a identificação de cada proteína. Esta análise foi gentilmente realizada pelo Dr. Gustavo de Souza – Instituto de imunologia de Oslo, Noruega, em espectrômetro QExactive com os dados analisados no software MaxQuant e Perseus.

Após aplicar os filtros utilizados para identificar proteínas diferencialmente acumuladas, foram encontradas 23 proteínas significativamente mais abundantes em -N T1 e 193 proteínas significativamente mais abundantes em -N T2, ambas em comparação com a condição de alto nitrogênio (+N).

5.1 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ACUMULADAS NO PROTEOMA

5.1.1 Adaptação proteômica inicial em resposta à limitação de nitrogênio (-NT1)

Primeiramente foram avaliadas as proteínas obtidas das células de *E. coli* coletadas nos primeiros 30 minutos de privação de nitrogênio (Figura 6A – T1) e comparadas com o proteoma das células em abundâncias de nitrogênio (Figura 6B). Esta análise indicou um total de 23 proteínas com aumento de sinal em resposta à limitação de nitrogênio (tabela 2). Dezesete dessas proteínas possuem promotores sigma54, que são ativados pelo regulador transcricional NtrC fosforilado (tabela 2) baseado no banco de dados Ecocyc (Karp *et al.*, 1998) e nos dados publicados por Brown *et al.*, 2014 e Zimmer *et al.*, 2000.

Tabela 2. Proteínas induzidas após 30 minutos em privação de nitrogênio (resposta inicial)

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativada por NtrC
328,04	P75898	Pirimidina monooxigenase RutA	<i>rutA</i>	σ^{54}	S
110,25	P75897	Amidohidrolase RutB	<i>rutB</i>	σ^{54}	S
102,65	P0AFW2	Fator de modulação de ribossomo	<i>rmf</i>	σ^{54*}	N
37,79	P0AE37	Arginina N-succiniltransferase	<i>astA</i>	$\sigma^S, \sigma^{54}, \sigma^{70}$	S
36,43	P77581	Succinilornitina transaminase	<i>astC</i>	$\sigma^S, \sigma^{54}, \sigma^{70}$	S
32,34	P75894	Provável malonil semialdeído redutase RutE	<i>rutE</i>	σ^{54}	S
31,57	P76216	N-succinilarginina dihidrolase	<i>astB</i>	$\sigma^S, \sigma^{54}, \sigma^{70}$	S
19,37	P75895	Putativo aminoacrilato hidrolase RutD	<i>rutD</i>	σ^{54}	S
17,86	P76621	Proteína CsiD	<i>csiD</i>	σ^S	N
11,78	P39298	Esterase YjFP	<i>yjFP</i>	σ^{24}, σ^{32}	SI
11,40	P76217	N-succinilglutamato 5-semialdeído dehidrogenase	<i>astD</i>	$\sigma^S, \sigma^{54}, \sigma^{70}$	S
7,89	Q46851	L-gliceraldeído 3-fosfato redutase	<i>yghZ</i>	NI	SI
6,03	P0ABQ2	2-hidroxi-3-oxopropionato redutase	<i>garR</i>	σ^{70}	N
4,85	P76128	Provável proteína periplasmática DdpA	<i>ddpA</i>	σ^S, σ^{54}	S
4,18	P0AC55	Proteína reguladora de nitrogênio P-II 2	<i>glnK</i>	σ^{54}	S
3,96	P76235	UPF0229 proteína YeaH	<i>yeaH</i>	σ^{54}	S
3,02	P0ACY3	Proteína YeaG (não caracterizada)	<i>yeaG</i>	σ^{54}	S
2,77	P0AFB5	Proteína reguladora de nitrogênio NR(II)	<i>glnL</i>	σ^{70}, σ^{54}	S
2,51	P42588	Putrescina aminotransferase	<i>patA</i>	σ^{54}	S
2,43	P37767	Regulador transcricional YfhH	<i>yfhH</i>	NI	SI
2,40	P0AFB8	Proteína reguladora de nitrogênio NR(I)	<i>glnG</i>	σ^{70}, σ^{54}	S
2,29	P09551	Proteína periplasmática ligação Lisina-arginina-ornitina	<i>argT</i>	σ^{54}	S
2,05	P0A9C5	Glutamina sintetase	<i>glnA</i>	σ^{70}, σ^{54}	S

Fold change representa a média relativa da indução das proteínas na condição de -N T1 comparado com a condição +N. As informações de promotor e ativador foram manualmente obtidas do banco de dados Ecocyc. SI, sem informação disponível, S, sim, N, não. O código UNIPROT das proteínas que também estão induzidas em -NT2 estão preenchidos em cinza. *Promotor sigma54 do gene *rmf* foi obtido de Bonocora *et al.*, 2015; e Reitzer e Schneider, 2001. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

Sob condições limitantes de amônio, a principal resposta da célula é via sistema Ntr, onde as proteínas PII tem um papel central controlando a atividade de outras proteínas (figura 7). A proteína UTase/UR (GlnD) tem sua atividade uridilil transferase estimulada em condições limitantes de nitrogênio e catalisa a transferência de um grupamento UMP às proteínas PII GlnB e GlnK (Bloom *et al.*, 1978; Brown, Segal e Stadtman, 1971; Peng Jiang, James A. Peliska e Ninfa*, 1998). GlnB-UMP acumula favorecendo a fosforilação de NtrC por NtrB (Jiang *et al.*, 2000). NtrC-P ativa a transcrição de vários genes envolvidos no uso de fontes alternativas de nitrogênio (Zimmer *et al.*, 2000). Uma vez que amônio seja abundante, GlnB desuridililada interage com NtrB que age como NtrC-P fosfatase, desativando a transcrição a partir dos promotores sigma54 dependentes de NtrC (Jiang e Ninfa, 1999b) (figura 7).

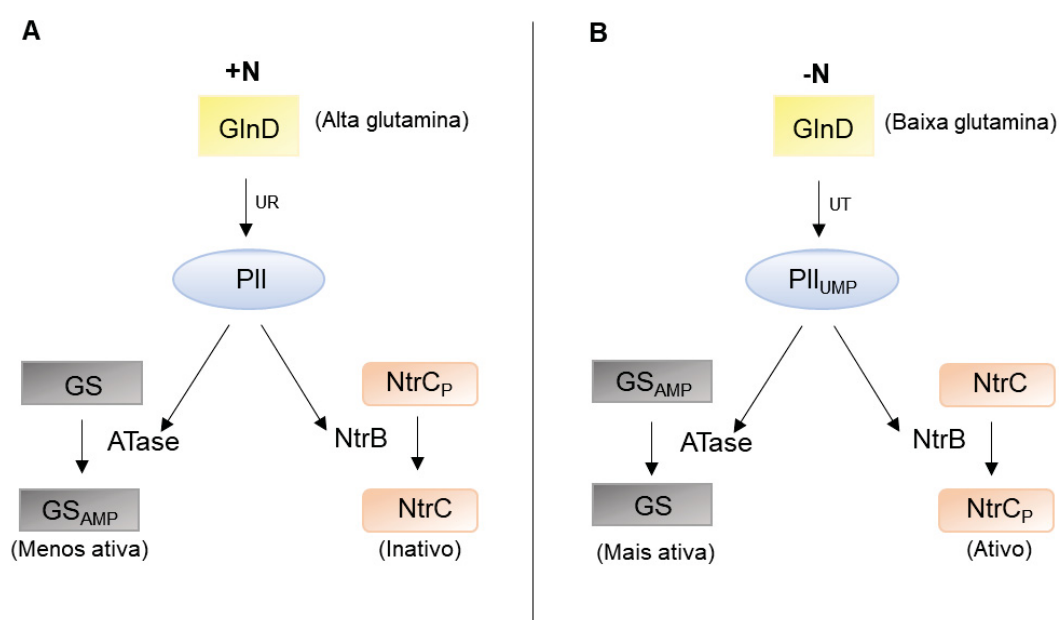


Figura 7. Controle do sistema Ntr pelas proteínas PII. A) Sob condição de alto nitrogênio, a proteína sensora de glutamina GlnD terá sua atividade removedora de uridilil (UR) ativada e conseqüentemente causa a desuridililação das proteínas PII. GlnB e GlnK desuridililadas interagem com NtrB estimulado a desfosforilação e conseqüente inativação do regulador transcricional NtrC. GlnB e GlnK também interagem com a proteína ATase estimulando a inativação da GS por adenilação. B) Sob condição de baixo nitrogênio, a proteína GlnD terá sua atividade uridililtransferase (UTase) estimulada e conseqüentemente promove a uridililação das proteínas PII. GlnB e GlnK uridililadas não são capazes de interagir com NtrB. Nessa condição, NtrB fosforila a proteína NtrC ativando-a. As formas uridililadas das proteínas PII interagem com a enzima ATase promovendo a ativação da GS por adenilação. Fonte: a autora.

As proteínas PII também regulam a atividade da proteína glutamina sintetase (GS) pela ação da enzima adenililtransferase (ATase) (Figura 7). Em alto nitrogênio,

a ATase se complexa com GlnB e glutamina e catalisa a adenilação de GS, inativando-a. Em baixo nitrogênio, a GS é ativada por desadenilação catalisada pela ATase complexada a GlnB-UMP (Brown, Segal e Stadtman, 1971; Ninfa e Jiang, 2005).

A regulação do sistema de dois componentes NtrB/NtrC e ATase é feita principalmente pela proteína GlnB, porém, GlnK também pode controlar a atividade dessas duas proteínas, mas de forma menos eficiente (Atkinson e Ninfa, 1999; Brown, Segal e Stadtman, 1971).

Durante a análise proteômica, procurou-se por modificações pós-traducionais de modificação de tirosina por uridililação utilizando o software Andromeda. As proteínas GlnB e GlnK uridililadas foram identificadas e o sinal do peptídeo modificado por uridililação foi quantificado relativamente ao total de proteína de cada amostra. Esta análise revelou que GlnB-UMP estava 4,2x mais abundante que GlnB não modificada no tratamento -N T1 quando comparado ao tratamento +N (figura 8A). Portanto, em uma condição de privação de amônio, GlnB é rapidamente uridililada levando a fosforilação de NtrC que irá desencadear a ativação de vários genes em resposta à limitação de nitrogênio (Rippe, Mücke e Schulz, 1998). A proteína GlnK foi encontrada mais abundante em sua forma uridililada após 30 minutos em privação de nitrogênio (figura 8B).

A busca por adenililação de tirosina não identificou o peptídeo adenilado da enzima GS na condição -NT1, no entanto GS-AMP foi encontrada na condição +N, como esperado (figura 8C).

Estes dados indicam que após somente 30 minutos de privação de nitrogênio, GlnB é acumulada em sua forma uridililada levando à ativação de GS e à indução de genes envolvidos na busca de fontes alternativas de nitrogênio através de NtrC-P. Dentre as enzimas induzidas nessa condição estão as pertencentes às vias de catabolismo da arginina (*operon asT*), pirimidina (*operon ruT*) e putrescina (*operon paT*) (tabela 2). Juntas, essas vias quebram compostos ricos em nitrogênio gerando glutamato e/ou NH_4^+ que podem ser necessários para manter a quantidade mínima de glutamato e glutamina necessária para reações celulares biosintéticas (figura 9). O amônio produzido por essas vias pode ser facilmente assimilado através da GS que está 2,5 x mais abundante (tabela 2) e desadenilada (mais ativa) na condição -NT1 (figura 8C).

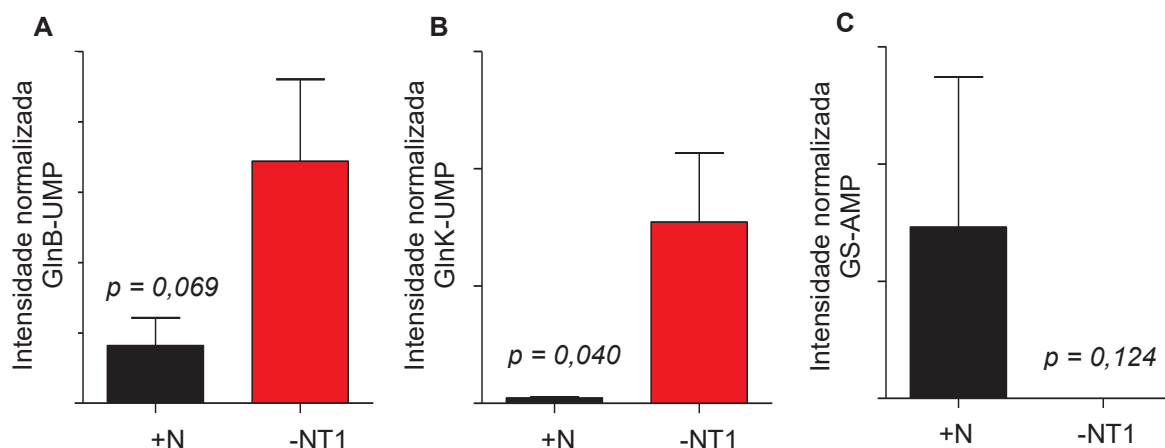


Figura 8. Comparação da intensidade normalizada dos peptídeos modificados de GlnB, GlnK e GS na condição -NT1 comparado com +N. A intensidade normalizada de cada peptídeo modificado foi calculada dividindo a intensidade desse peptídeo pela intensidade total dos peptídeos em cada análise de LC/MS/MS. GlnB, GlnK e GS estavam modificadas nos respectivos sítios: _GAEY(UMP)MVDFLPK_ (GlnB), _GAEY(UMP)SVNFLPKVK_ (GlnK), _NLY(AMP)DLPPEEAKEIPQVAGSLEEALNELDLDFREFLK_ (GS). As modificações identificadas tiveram probabilidade posterior de erro (PEP) de $1,54 \times 10^{-5}$, $1,03 \times 10^{-13}$, $3,84 \times 10^{-14}$ e pontuação de 92, 144, 115 para GlnB, GlnK e GS, respectivamente. Os gráficos representam a média normalizada dos valores de 3 replicatas biológicas independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão das amostras. Análise estatística foi realizada usando T test. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

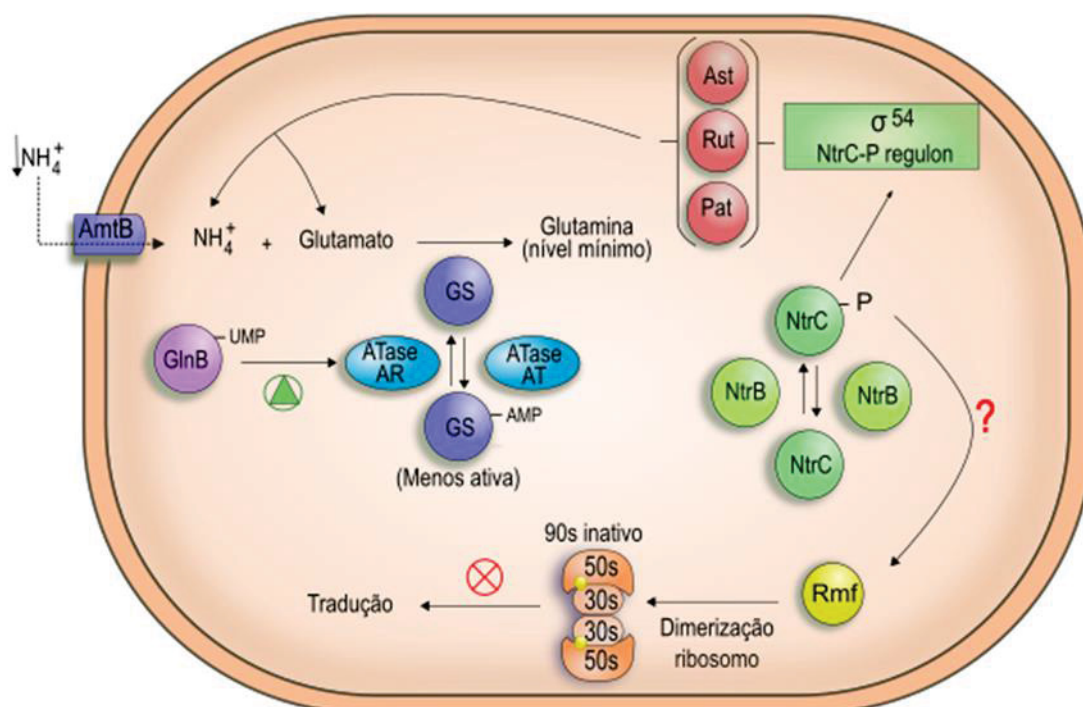


Figura 9. Visão geral da adaptação inicial (-NT1) do proteoma de *E. coli* em resposta à limitação de nitrogênio. Em uma condição limitante de nitrogênio, NH_4^+ entra na célula principalmente via transportador AmtB. Baixa glutamina intracelular promove o acúmulo de GlnB-UMP favorecendo a atividade AR da ATase levando a desadenilação da GS e sua consequente ativação. NtrC é fosforilado por NtrB. NtrC-P ativa a transcrição de vários promotores sigma54 que estão envolvidos no uso de fontes alternativas de nitrogênio como a via de catabolismo de arginina (AST), via de catabolismo de

pirimidinas (RuT) e catabolismo de putrescina (PaT). Juntas, essas vias quebram compostos ricos em nitrogênio para suprir a demanda mínima de NH_4^+ e glutamato para as reações biosintéticas. O amônio liberado pode ser assimilado à glutamina pela GS. A proteína Rmf é induzida por um mecanismo ainda desconhecido e liga a subunidade 30s do ribossomo convertendo o ribossomo ativo 70s em um ribossomo inativo 90s. Essa dimerização do ribossomo diminui os níveis de tradução e a consequente utilização de aminoácidos. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

Outro conjunto de proteínas encontrado mais abundante na condição -NT1 é o de transportadores ABC (tabela 2), incluindo a proteína transportadora de arginina (ArgT) e a proteína transportadora de D-Alanina-D-Alanina dipeptídeo (DdpA). Alguns autores especularam que existe um aumento de diaminopemilato no peptideoglicano de bactérias em resposta à limitação de nitrogênio; isto resultaria na liberação de D-Ala-D-Ala dipeptídeo (Zimmer *et al.*, 2000), que poderia ser transportado pela proteína DdpA e usado como fonte alternativa de nitrogênio.

Quatro proteínas transdutoras de sinal foram encontradas mais abundantes durante o estresse por nitrogênio, são elas o sistema de dois componentes NtrBC (GlnGL), GlnK e o regulador transcricional não caracterizado YfhH (tabela 2). Em *E. coli*, *glnK* e *amtB* estão no mesmo operon (Heeswijk, Van *et al.*, 1996), porém, AmtB não foi encontrada na análise proteômica, provavelmente devido à sua alta hidrofobicidade e baixa abundância de sítios de tripsinização.

Outras proteínas encontradas mais abundantes em -NT1 e que possuem funções ainda pouco caracterizadas foram CsiD, GarR, YeaG e YeaH. Essas proteínas podem estar envolvidas de alguma forma na resposta à limitação de nitrogênio ou entrada na fase estacionária, uma vez que, com exceção de GarR, também foram encontradas mais abundantes na condição -NT2 (após 60 minutos sem nitrogênio).

As proteínas YeaG e YeaH são codificadas pelo operon *yeaGH* e são transcritas a partir de um promotor sigma54 dependente de NtrC (tabela 2). Foi mostrado recentemente que YeaG é uma serina/treonina quinase necessária para a viabilidade celular durante privação de nitrogênio (Figueira, Brown, Ferreira, Eldridge, Burchell, Kumar, *et al.*, 2015). YeaG reprime a expressão das toxina-antitoxina *mqsA/mqsR* e *dinJ/yafQ* durante privação de nitrogênio prolongada (24 h), afetando a resposta a estresse mediada por RpoS (Figueira, Brown, Ferreira, Eldridge, Burchell, Kumar, *et al.*, 2015).

O fator de regulação de ribossomo (Rmf) foi uma das proteínas mais abundantes na condição -NT1 (tabela 2). A Rmf se liga à subunidade 30S do ribossomo ativo 70S e promove sua dimerização tornando-o no ribossomo inativo 90S (Yoshida *et al.*, 2002). Como discutido a seguir (subtítulo 5.1.2), outras proteínas responsáveis pela inativação do ribossomo também estavam induzidas na condição -NT2. Portanto, a parada do ribossomo parece ser um mecanismo chave para a sobrevivência da célula durante a privação de nitrogênio (figura 9).

Embora Rmf tenha sido encontrada 103x mais abundante na condição -NT1, ela não apareceu induzida na condição -NT2. Logo, parece que essa proteína é acumulada apenas momentaneamente na transição de uma condição rica em nitrogênio para uma condição com limitação de nitrogênio.

5.1.2 Adaptação proteômica tardia em resposta a privação de nitrogênio (-NT2)

Em um segundo momento, foi comparado o proteoma de *E. coli* que ficou em privação de nitrogênio durante 60 minutos (figura 6A - T2) com o proteoma de *E. coli* cultivado em alto amônio (figura 6B). Estas análises indicaram 193 proteínas induzidas em resposta a privação de nitrogênio na condição -NT2 (apêndice 1), sendo que dessas 15 também estavam induzidas em -NT1 (tabela 2 - preenchidas em cinza).

Uma busca por modificações pós-traducionais mostrou que GlnB, GlnK e GS continuam com padrão similar ao observado em -NT1 (Figura 10).

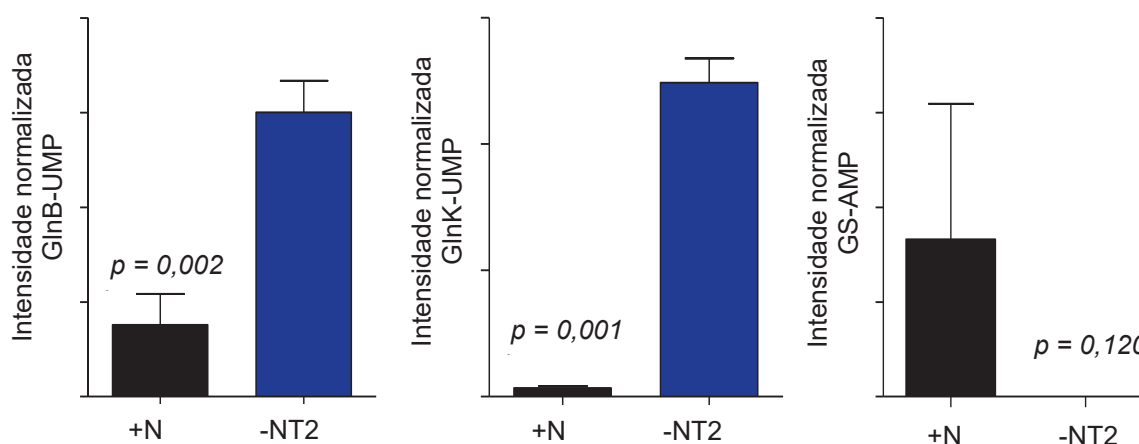


Figura 10. Comparação da intensidade normalizada dos peptídeos modificados de GlnB, GlnK e GS na condição -NT2 comparado com +N. A intensidade normalizada de cada peptídeo modificado foi calculada dividindo a intensidade desse peptídeo pela intensidade total dos peptídeos em cada

análise de LC/MS/MS. GlnB, GlnK e GS estavam modificadas nos respectivos sítios: _GAEY(UMP)MVDFLPK_ (GlnB), _GAEY(UMP)SVNFLPKVK_ (GlnK), _NLY(AMP)DLPPEEAKEIPQVAGSLEEALNELDLDRFLK_ (GS). As modificações identificadas tiveram probabilidade posterior de erro (PEP) de $1,30 \times 10^{-5}$, $9,44 \times 10^{-15}$, $1,60 \times 10^{-15}$ e pontuação de 119, 161, 115 para GlnB, GlnK e GS, respectivamente. Os gráficos representam a média normalizada dos valores de 3 replicatas biológicas independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão das amostras. Análise estatística foi realizada usando T test. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

A classificação por COG (cluster of orthologous groups) mostrou que 45% das proteínas induzidas em -NT2 estão envolvidas com metabolismo e, dessas, 29% estão envolvidas em transporte e metabolismo de aminoácidos (figura 11).

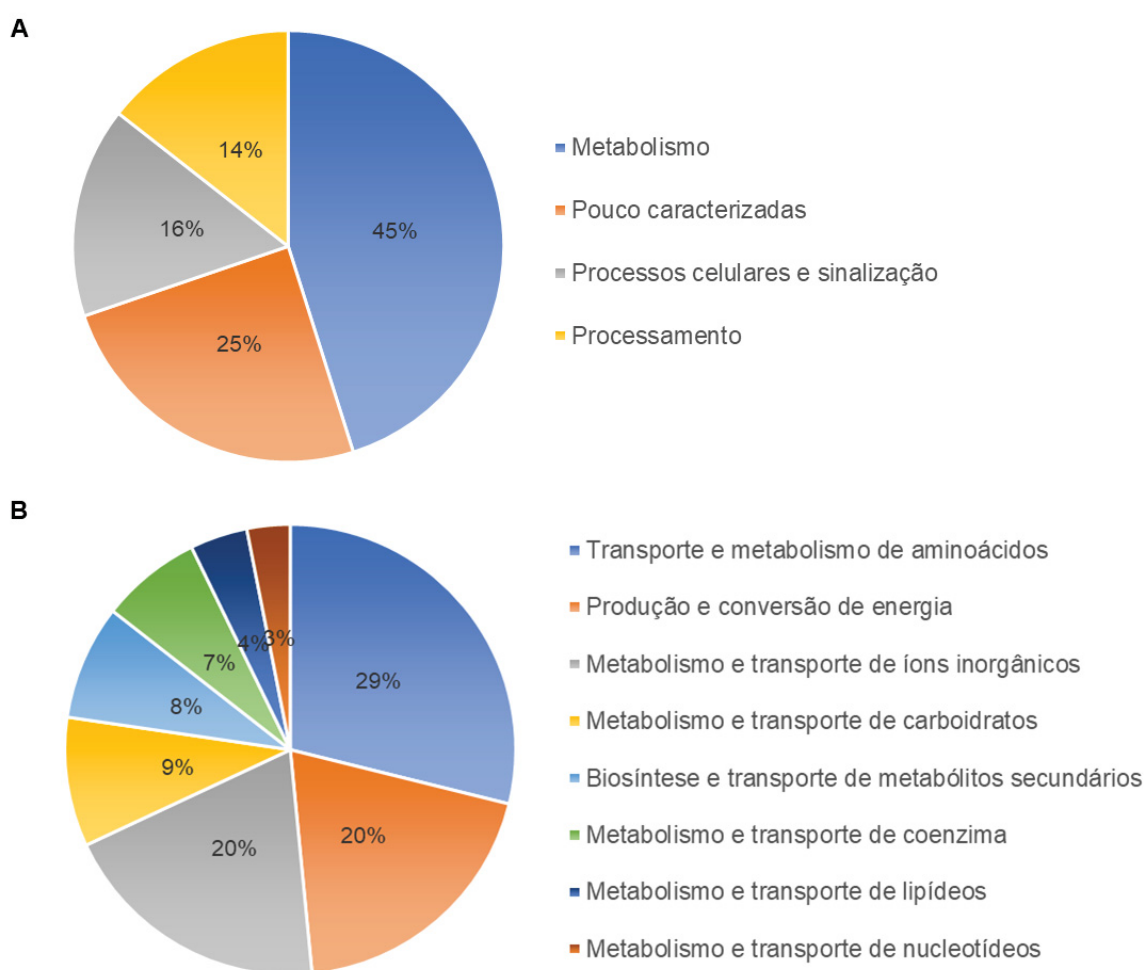


Figura 11. Distribuição funcional das proteínas induzidas em resposta à limitação de nitrogênio (-NT2). (A) COG – categorias gerais e (B) COG – categoria proteínas envolvidas com metabolismo. Fonte: a autora.

Como esperado, a adaptação proteômica de *E. coli* após 60 minutos em privação de nitrogênio (-NT2) é muito mais ampla que a adaptação proteômica inicial

que ocorre em apenas 30 minutos (-NT1). A resposta em -NT2 envolve vários outros reguladores transcricionais além do NtrC (apêndice 1). Por exemplo, em -NT2 ocorre a indução do regulador transcricional Nac (*nitrogen assimilation control protein*). NtrC-P ativa a transcrição de *nac* e a proteína Nac ativará uma gama de promotores sigma70 envolvidos em resposta a estresse por nitrogênio (Frisch e Bender, 2010; Heeswijk, van, Westerhoff e Boogerd, 2013; Zimmer *et al.*, 2000).

Uma maior exposição a privação de nitrogênio promove também expressão de proteínas envolvidas na conversão de *E. coli* em um estado de dormência (tabela 3, figura 12). O acúmulo das proteínas IHF, Dps, HupA e HupB resultará na condensação do DNA (Almirón *et al.*, 1992; Ishihama, 1999; Wolf *et al.*, 1999), que por sua vez fará diminuir os níveis de transcrição. A indução de Ribonuclease I e RelE resultará na degradação do RNA e a indução de Hpf, RaiA, YqjC e YqjE resultará na inibição da tradução (Starosta *et al.*, 2014) (tabela 3, figura 12).

Tabela 3. Proteínas que podem ajudar a promover um estado de dormência em *E. coli* em resposta à privação de nitrogênio prolongada.

<i>Fold Change</i>	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Função Biológica
6,7	P0C077	RelE	<i>relE</i>	Inibição da tradução
6,3	P0AFX0	Fator de hibernação de ribossomo	<i>hpf</i>	Inibição da tradução
4.5	P0A6X7	Fator de integração sub. alfa	<i>IHF</i>	Regulação da transcrição e tradução
4,5	P0AD49	Inibidor A de associação com ribossomo	<i>raiA</i>	Inibição da tradução
4,0	P42616	Proteína YqjC	<i>yqjC</i>	Envolvida na inibição da tradução*
3,1	P21338	Ribonuclease I	<i>Rna</i>	Catabolismo de RNA
2,9	P0ABT2	Proteína de ligação ao DNA	<i>dps</i>	Compactação de DNA
2.9	P0ACF4	Proteína de ligação ao DNA HU-beta	<i>hupB</i>	Regula a transcrição
2,8	P52106	Proteína reguladora CsgBAC	<i>csgD</i>	Regulador transcricional necessário para a formação de biofilme
2,3	P64585	Proteína YqjE	<i>yqjE</i>	Envolvida na inibição da tradução*
2,1	P0ACF0	Proteína de ligação ao DNA HU-alpha	<i>hupA</i>	Compactação de DNA
2,1	P0A832	Proteína de ligação à SsrA	<i>smpB</i>	Marca proteínas paralizadas durante a tradução para degradação
-4,2	P0C079	Antitoxina RelB	<i>relB</i>	Par RelE toxina-antitoxina, regulação da transcrição
-4,3	P0A6E6	ATP sintase subunidade epsilon	<i>atpC</i>	Síntese de ATP
-4,6	P0AD68	Peptideoglicano sintase FtsI	<i>ftsI</i>	Divisão celular
-4,8	P0ABA4	ATP sintase subunidade delta	<i>atpH</i>	Síntese de ATP acoplado ao transporte de próton

Fold change representa a média do acúmulo de proteína na condição -NT2 em comparação com +N. Função biológica foi manualmente retirada do banco de dados Ecocyc/UNIPROT. *Possível função biológica sugerida por (Yoshida *et al.*, 2012). Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

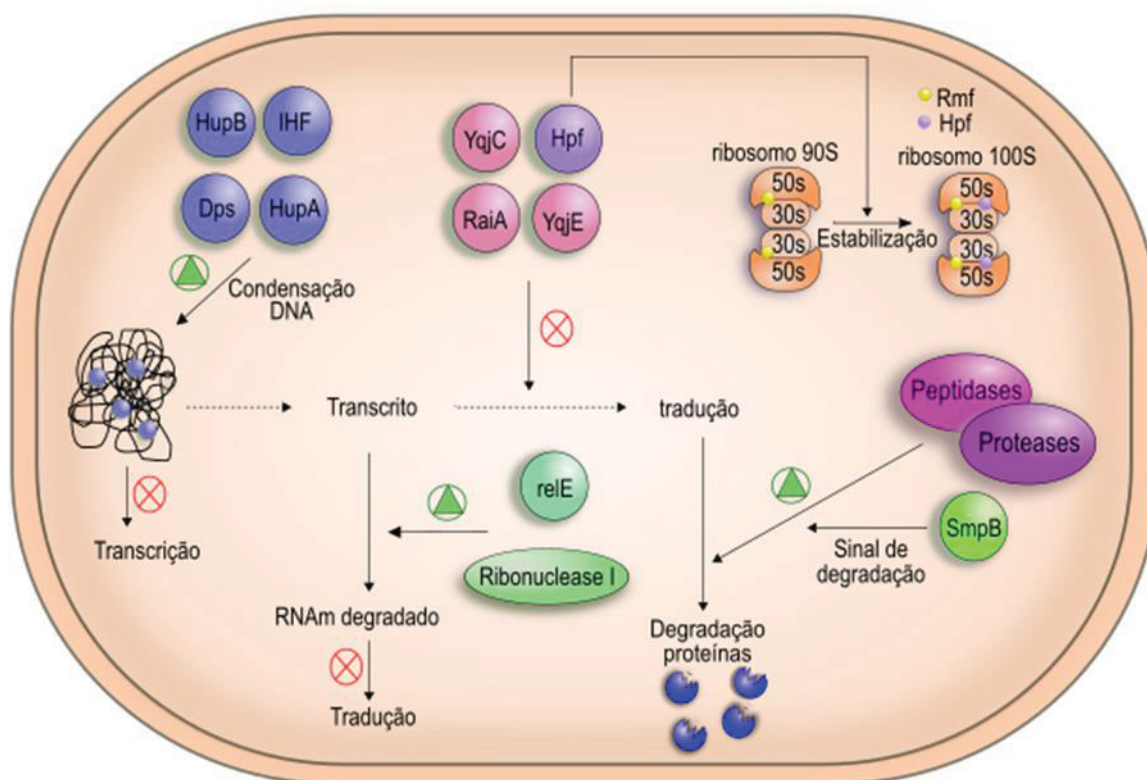


Figura 12. Visão geral da adaptação proteômica de *E. coli* em resposta à privação de nitrogênio prolongada (-NT2). Uma exposição mais longa à privação de nitrogênio leva a indução de proteínas que são capazes de converter *E. coli* em um estado de dormência. As proteínas Dps, IHF, HupB e HupA agem na condensação do DNA diminuindo os níveis de transcrição. A indução de RelE e Ribonuclease I irá resultar na degradação de RNA e RaiA, YqjE e YqjC agem inibindo a tradução através de mecanismos ainda desconhecidos. A proteína Hpf inibe a tradução através da estabilização do dímero de ribossomo inativo 90s. SmpB marca proteínas para degradação pelas diversas peptidases/proteases que estão induzidas nesta condição. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

Os ribossomos podem parar durante a tradução de uma proteína, principalmente quando traduzindo mRNA incompleto ou danificado. Quando o ribossomo chega no final de um mRNA antes de encontrar um códon de terminação, a etapa de translocação leva a formação de um “complexo de não terminação” estável, no qual o sítio A não tem mRNA para interagir com um novo tRNA carregado. Esse complexo não pode ser resolvido pelos fatores de terminação normais, em vez disso, o ribossomo é resgatado por um processo chamado de tradução trans (*trans-translation*) (Neubauer *et al.*, 2012). Em procarionotes o sistema de resgate é bem conservado e consiste em um RNA denominado RNA mensageiro e de transferência (tmRNA) e a proteína SmpB. O tmRNA possui dois domínios: o domínio tRNA-like

(TLD) e o domínio mRNA-like (MLD). O domínio TLD é reconhecido pela alanil-tRNA sintetase e o terminal 3' do tmRNA é carregado com um resíduo de alanina. O complexo formado por tmRNA e SmpB entra no sítio A do ribossomo, onde SmpB mimetiza o anticódon do tRNA alanina. Então, através da hidrólise de GTP, o resíduo que está no tRNA localizado no sítio P é transferido para o resíduo de alanina do tmRNA no sítio A e a tradução ocorre no domínio MLD do tmRNA. O peptídeo C-terminal é codificado no MLD e com o auxílio da proteína SmpB é sinalizada a necessidade de degradação desse peptídeo (Karzai, Susskind e Sauer, 1999; Pletnev *et al.*, 2015; Starosta *et al.*, 2014).

A proteína SmpB estava 2,1x mais abundante na condição de privação de nitrogênio após 60 minutos (tabela 3 e apêndice 1). As proteínas sinalizadas para degradação por SmpB e proteínas não úteis para esse momento celular serão degradadas por uma série de proteases/peptidases que estavam induzidas em -NT2 (YdcP, HtpX, YdgD, PepA, PepB, PepT) (figura 12, apêndice 1). Estas mudanças provavelmente induzirão as células a se protegerem, por exemplo, através da formação de biofilmes.

De fato, o regulador transcricional necessário para a formação de biofilme CsgD (Brombacher *et al.*, 2003) também estava induzido (2,8x) em -NT2 (tabela 3). Essa proteína pertence à família *luxR* e é necessária para a expressão do operon *csgBA*, que codifica os componentes estruturais do curli. Curli é um tipo de fimbria de composição proteica (curlina) presente em *E. coli* e *Salmonella spp* que está envolvida na adesão inicial da célula bacteriana a uma superfície sólida e/ou nos passos subsequentes para a formação de biofilme (Brombacher *et al.*, 2003; Hammar *et al.*, 1995).

Particularmente interessante foi a expressão do par toxina-antitoxina (TA) RelE-RelB. RelE é uma toxina que cliva mRNA ligado ao ribossomo e sua atividade é regulada pela anti-toxina RelB através da interação proteína-proteína. A transcrição de *relBE* é induzida por privação de aminoácidos. Nessas condições, RelB é degradada pela protease Lon e RelE se torna ativa (Christensen *et al.*, 2001). Os dados encontrados no proteoma são explicáveis por este modelo, uma vez que foi observado um acúmulo de RelE (6,7x) e uma diminuição de RelB (-4,2x) na condição -NT2 (tabela 3).

A privação de nitrogênio prolongada causou a redução de 215 proteínas. Trinta dessas proteínas estão envolvidas com o metabolismo de coenzima, incluindo enzimas para a síntese de biotina, tiamina, piridoxal, riboflavina e dihidrofolato (apêndice 2). Houve também uma grande diminuição no acúmulo de várias proteínas envolvidas na produção do sideróforo enterobactina e transporte de ferro (apêndice 2). Outras evidências de que a atividade metabólica foi reduzida em 60 minutos de privação de nitrogênio é a diminuição no acúmulo dos componentes da ATP sintase AtpH e AtpC e das proteínas ribossômicas L32, S19, L29, S11, S16 ES14 (apêndice 2 e tabela 3).

A classificação por COG das proteínas que tiveram menor abundância em -NT2 revelou que 49% delas estão envolvidas com metabolismo e, dessas, 26% estão envolvidas com transporte e metabolismo de aminoácidos e 25% estão envolvidas com transporte e metabolismo de coenzimas (apêndice 2, figura 13).

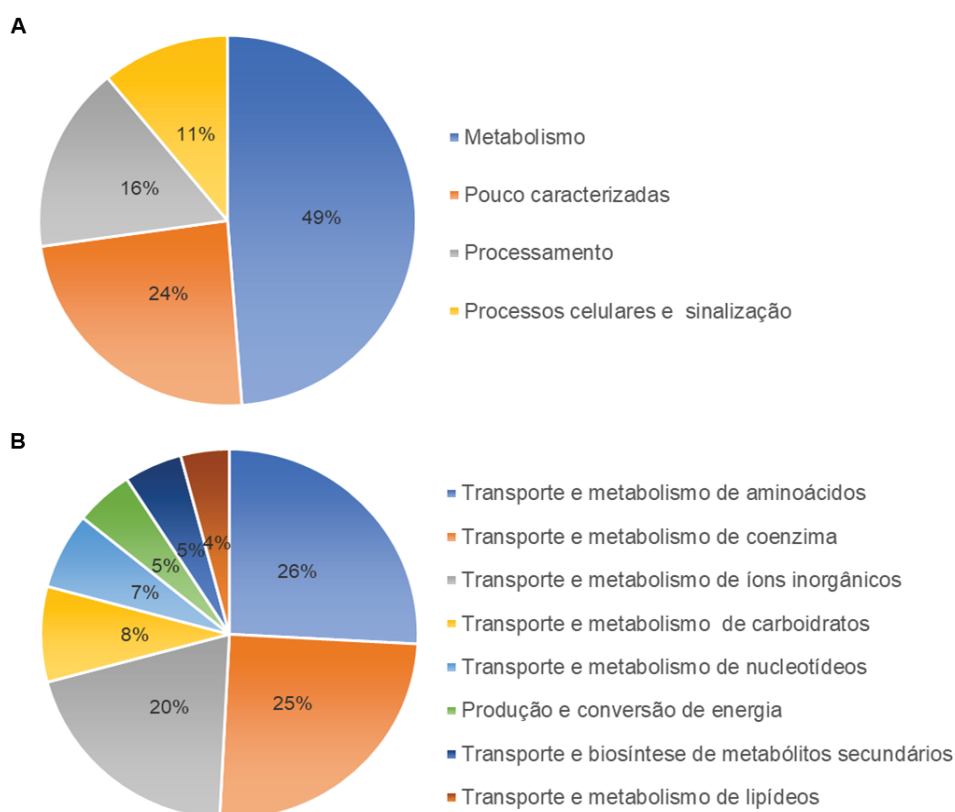


Figura 13. Distribuição funcional das proteínas menos abundantes em -NT2. (A) COG – categorias gerais e (B) COG – categoria proteínas envolvidas com metabolismo. Fonte: a autora.

De acordo com o cessar do crescimento em -NT2, o acúmulo de proteínas envolvidas na biossíntese de desoxiribonucleotídeos usados para a replicação do DNA (NrdE, NrdH e NrdB) e síntese de peptídeoglicano (FtsI) diminuíram (tabela 3, apêndice 2). Houve também uma grande diminuição nos níveis de diferentes isoformas da acetolactato sintase ALS, uma enzima chave para a síntese da cadeia lateral de aminoácidos (apêndice 2). Este dado está de acordo com os níveis reduzidos de enzimas envolvidas na biossíntese de tiamina, coenzima de ALS. Contudo, esses dados indicam que uma exposição prolongada a privação de nitrogênio causa a diminuição no acúmulo de diversas proteínas necessárias para a replicação celular e metabolismo geral em *E. coli*.

Os dados do proteoma na condição -NT2 indicaram que 11 das 20 proteínas com maior diminuição de abundância são expressas a partir de promotores que são negativamente controlados por Fur (apêndice 2). Fur é um regulador transcricional sensível a Fe^{2+} que age como ativador ou repressor de genes envolvidos no metabolismo do ferro e estresse oxidativo (McHugh *et al.*, 2003). A diminuição significativa de proteínas envolvidas na produção de sideróforos e absorção de ferro na condição -NT2 sugere que células em privação de nitrogênio estão sujeitas a abundância de ferro, enquanto as células na condição +N experimentam escassez de ferro. Esta suposição está de acordo com a forte indução de proteínas que armazenam ferro como as ferritinas, bacterioferritinas e Dps em -NT2 (apêndice 1). Uma hipótese seria que as células metabolicamente inativas em resposta a privação de nitrogênio prolongada apresentariam redução da demanda de ferro afetando, portanto, a expressão dos genes regulados por Fur. Outras proteínas envolvidas na absorção de microelementos (Mo, Zn, S) também estavam menos abundantes em -NT2, sugerindo que este efeito não é específico para o ferro.

5.1.3 Outras proteínas regulatórias com acúmulo alterado

Além das proteínas regulatórias já discutidas previamente, os níveis de acumulação de outros reguladores também foram afetados pelos níveis de nitrogênio. O possível regulador transcricional YfhH estava induzido tanto em -NT1 quanto em -NT2 (tabela 2 e apêndice 1), portanto pode ter um papel importante na resposta ao

estresse por nitrogênio. Ainda não existe na literatura uma função definida para YfhH, embora ele contenha um sítio de ligação açúcar-fosfato que pode indicar envolvimento na sinalização deste sistema.

A enzima GppA, que é responsável pela conversão de (p)ppGpp a ppGpp, estava 3,2x induzida em -NT2 (apêndice 1). Isto auxilia o aumento de produção de ppGpp e, assim, a ativação da resposta estrigente em -NT2. Já a enzima CpdA, que é responsável pela degradação de cAMP, estava 9,7x diminuída em -NT2 (apêndice 2), sugerindo que deve ocorrer acúmulo de cAMP durante a privação de nitrogênio.

Alguns trabalhos sugerem que ocorre o aumento da expressão de promotores RpoS (sigma38) dependentes sob um regime de privação de nitrogênio pelo aumento da meia vida e/ou atividade de RpoS (Battesti, Majdalani e Gottesman, 2011; Mandel e Silhavy, 2005; Zafar *et al.*, 2014). Entretanto, RpoS não teve seu acúmulo alterado em nenhuma das condições testadas neste trabalho, apesar das proteínas IraP e DinJ conhecidas por afetar o acúmulo de RpoS (Battesti, Majdalani e Gottesman, 2011), terem sido encontradas alteradas em -NT2.

5.2 EFEITO DA PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DAS FUSÕES TRANSCRICIONAIS PROMOTOR:*gfp*

Após analisar os dados obtidos no proteoma, alguns genes foram selecionados para ter a expressão de seus promotores avaliada. Este ensaio foi realizado utilizando uma biblioteca comercial de promotores de *E.coli* fusionados transcricionalmente ao gene reporter *gfp* (GE-Healthcare) (Zaslaver *et al.*, 2006). As células de *E. coli* MG1655 transformadas com o plasmídeo contendo a fusão de interesse foram cultivadas de forma similar às condições de cultivo do proteoma e foram posteriormente analisadas por citometria de fluxo, a fim de se obter dados quantitativos dos níveis de GFP que, por sua vez, correspondem à atividade do promotor que está sendo avaliado.

A avaliação dos níveis de GFP de cada promotor foi feita nas condições +N, -NT1 e -NT2 e as comparações foram realizadas entre a amostra em alto nitrogênio e as amostras em privação de nitrogênio (+N versus -NT1 e +N versus -NT2). O

promotor *glnK* foi utilizado como controle positivo do experimento por ser mais expresso em condição de privação de nitrogênio (Atkinson e Ninfa, 1999; Heeswijk, Van *et al.*, 1996) e o plasmídeo sem promotor foi utilizado como controle negativo (plasmídeo vazio). Na figura 14 A e B são apresentados os histogramas de fluorescência dos controles positivo e negativo, respectivamente. Na figura 14A é observado o aumento no nível de fluorescência de GFP através do promotor *glnK* na condição de privação de nitrogênio indicado pelo deslocamento do pico de fluorescência. Quando avaliada a expressão de GFP a partir do plasmídeo vazio, observou-se uma sobreposição dos níveis de fluorescência nas condições +N e -NT1 e +N e -NT2, indicando que não ocorre diferença significativa de expressão de GFP nesses casos (apenas observado *background* de fluorescência) (Figura 14B).

Ao todo foram avaliadas 17 regiões promotoras nas condições +N, -NT1 e -NT2, sendo que a fluorescência da condição +N de cada promotor foi determinada como sendo de 100% (figura 14C). Os genes *csiD*, *glnK*, *glnA*, *yfhH*, *htpX*, *yqjC*, *astC*, *ydgD* e *relE* tiveram sua ativação aumentada em resposta à privação de nitrogênio (figura 14). Estes dados corroboram os resultados obtidos no proteoma onde essas proteínas foram encontradas mais acumuladas em privação de nitrogênio indicando correlação entre níveis de proteína e mRNA.

A região promotora do gene *csiD* já foi estudada detalhadamente. Ela requer sigmaS e é ativada apenas sob condições de privação de carbono através de cAMP-CRP (Marschall *et al.*, 1998; Metzner, Germer e Hengge, 2003) . Ao contrário do encontrado na análise proteômica, estudos anteriores não conseguiram detectar a indução do promotor *csiD* em resposta à limitação de amônio (Marschall *et al.*, 1998). Esta discrepância poderia ser explicada por regulações pós-transcricionais, porém na análise com a fusão *csiD:gfp* também observou uma indução deste promotor (figura 14). Não foi encontrado sítio de ligação sigma54 ou NtrC na região promotora de *csiD* e a conexão entre a indução deste gene e a privação de nitrogênio ainda permanece elusiva.

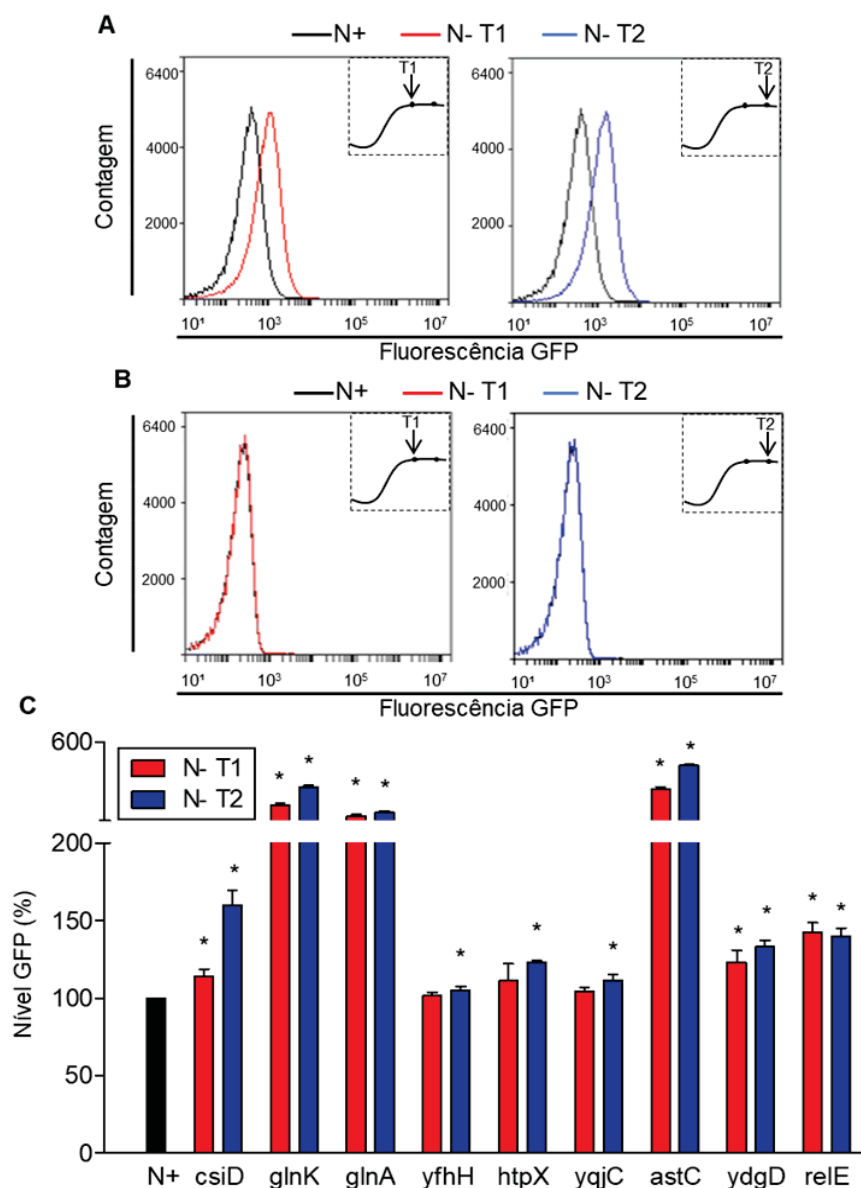


Figura 14. Expressão das fusões transcricionais promotor:*gfp* em resposta à privação de nitrogênio. Painéis superiores apresentam os histogramas do (A) controle positivo (*glnK::gfp*) e (B) controle negativo (plasmídeo pUA66 vazio). (C) Níveis de expressão de GFP através de diferentes promotores foram avaliados nas condições N- T1 e N- T2, sendo que o nível de fluorescência da condição N+ corresponde a 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata com barras representando o desvio padrão. Tratamentos sinalizados com * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) comparado ao controle N+. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

A proteína RelE, responsável pela degradação do RNA que está ligado ao ribossomo, estava 6,7x mais abundante na condição -NT2. Porém, um estudo recente não conseguiu detectar mRNA de *relE* após 24 horas de privação de nitrogênio (Figueira, *et al.*, 2015). Os dados obtidos com a fusão transcricional corrobora este

resultado, pois observou-se que a indução de *relBE:gfp* se dá de forma transiente, retornando a níveis mais baixos após 90 minutos de privação de nitrogênio (figura 15).

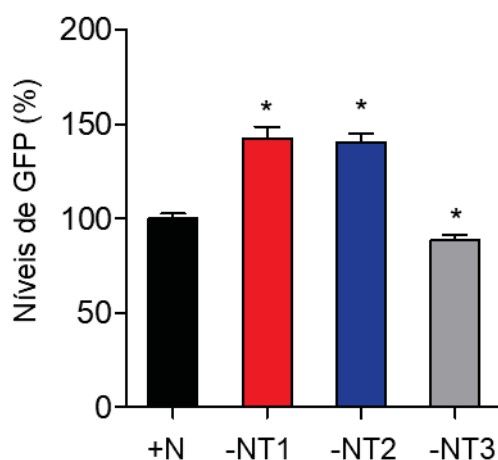


Figura 15. Expressão da fusão transcricional *relBE:gfp*. Níveis de fluorescência da GFP em condição de abundância (N+) e em privação de nitrogênio por 30 minutos (N- T1), 60 minutos (N- T2) e 90 minutos (-NT3). Fluorescência da condição +N corresponde a 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata com barras representando o desvio padrão. Tratamentos sinalizados com * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) comparado ao controle N+. Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

A atividade do promotor dos genes *IHF*, *argT*, *dps*, *hupB*, *pepB*, *hupA*, *rna* e *rmf* não se correlacionou com os dados obtidos no proteoma (figura 16), sugerindo que pode ocorrer eventos de regulação pós-transcricional e que para estes genes /proteínas não há uma correlação direta entre níveis proteicos e de expressão do respectivo promotor.

Dentre esses genes/proteínas avaliados, um alvo particularmente interessante é a proteína Rmf. Ela foi uma das proteínas com maior alteração de acúmulo em resposta à privação de nitrogênio, sendo que na condição -NT1 estava 103x mais abundante comparando-se com o cultivo +N e, por esse motivo, foi escolhida para ser avaliada mais profundamente.

A Rmf é capaz de diminuir os níveis de tradução da célula por se ligar ao ribossomo ativo 70S promovendo sua dimerização e consequente inativação (Wada *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2002). A ruptura do gene *rmf* causada pela inserção de um cassete de canamicina promove a perda dos dímeros 90S e a redução da viabilidade celular na fase estacionária (Yamagishi *et al.*, 1993).

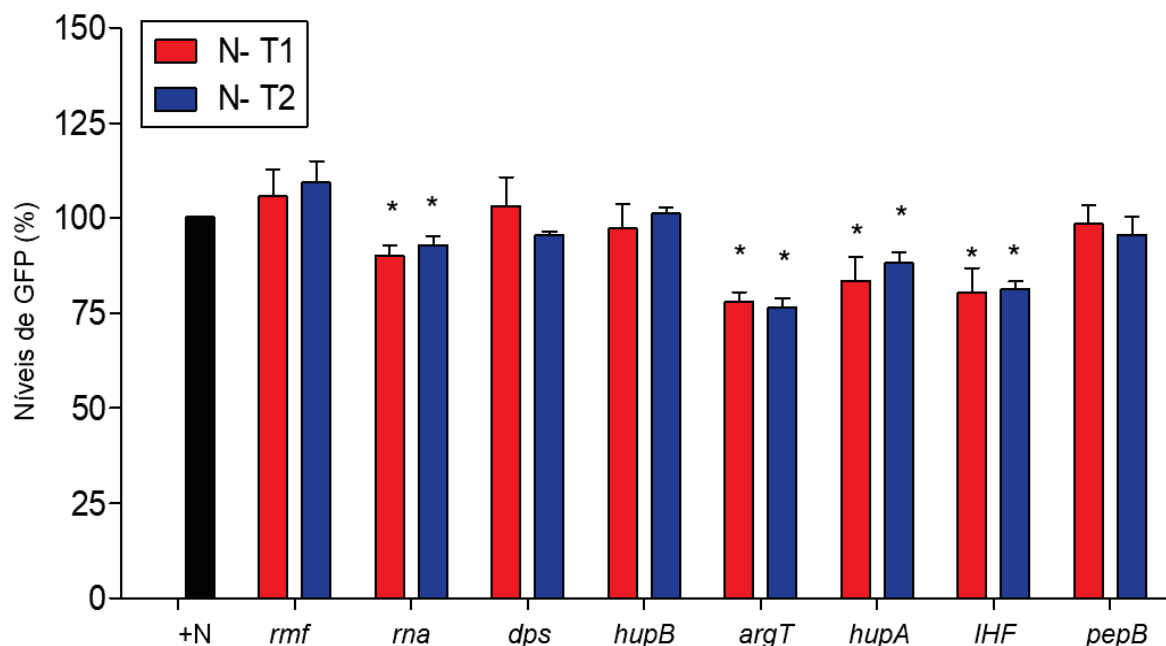


Figura 16. Expressão da fusão transcricional promotor:gfp. Níveis de fluorescência da GFP em condição de abundância (+N) e em privação de nitrogênio por 30 minutos (N- T1) e 60 minutos (N- T2). O nível de fluorescência da condição +N corresponde a 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata com barras representando o desvio padrão. Tratamentos sinalizados com * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) comparado ao controle +N. No caso da fusão IHF, o promotor analisado está localizado a montante dos genes de acordo com a organização de operon descrita no Ecocyc. *thrS:gfp* (operon *thrSinfCrpmLrplTpheMTIHF*). Fonte: adaptado de Sanchuki *et al.*, 2017.

A discrepância entre o acúmulo da proteína Rmf (tabela 2) e a expressão do promotor *rmf* (figura 16) pode ser resultado de algum evento de regulação pós-transcricional. De fato, já foi relatado que poliaminas são capazes de regular a expressão de Rmf. Elas são capazes de interagir com o mRNA e causar uma mudança conformacional em sua estrutura aumentando a tradução de Rmf (Terui *et al.*, 2010).

Como os experimentos não foram capazes de detectar um aumento da expressão do gene *rmf*, foram realizadas várias tentativas de detectar a proteína Rmf no extrato celular na condição -NT1 e na condição +N por *western-blotting*. Para isso, as células de *E. coli* MG1655 foram cultivadas de forma similar a realizada no ensaio de proteômica onde Rmf foi identificada 103x mais abundante na condição -NT1. Infelizmente, mesmo testando diferentes concentrações de anticorpo anti-Rmf (gerado a partir de um peptídeo sintético de Rmf), diferentes concentrações de proteína e diferentes tempos de transferência, as tentativas de confirmar o acúmulo de Rmf por *western-blotting* falharam. Algumas explicações seriam uma baixa

concentração de Rmf, e que impossibilitaria sua detecção ou o anticorpo gerado não ser específico o suficiente para conseguir detectar Rmf (dados não apresentados).

5.3 ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *rmf*

Visto que a proteína Rmf foi encontrada acumulada durante privação de nitrogênio e que análises de bioinformática e ChiP-seq indicaram um possível promotor sigma54 a montante do gene *rmf* que poderia fazer a conexão inexistente entre essa proteína e o metabolismo de nitrogênio, optou-se por avaliar a região promotora *rmf in vitro* e posteriormente fazer ensaios *in vivo* na tentativa de elucidar esse mecanismo.

5.3.1 Análise de bioinformática do promotor do gene *rmf*

Um estudo utilizando a técnica de chip-Seq revelou que o gene *rmf* possui um provável promotor sigma54 (BONOCORA *et al.*, 2015). De fato, analisando a região intergênica foi observado um provável sítio sigma54 a montante do gene *rmf* (figura 17), o que pode indicar que essa proteína de alguma forma responda aos níveis de nitrogênio celular. Além desse sítio, existe um sítio sigma 70 já conhecido e um provável sítio de ligação da proteína reguladora NtrC (figura 17). Este sítio de ligação de NtrC foi encontrado por um programa de bioinformática em desenvolvimento (Wilczek, 2019).

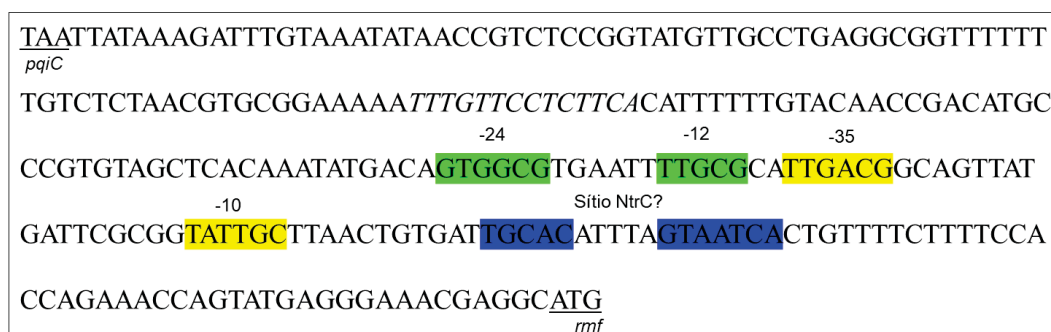


Figura 17. O promotor *rmf*. O códon de parada do gene *pqiC* e o códon de início do gene *rmf* estão sublinhados. Cores indicam: Verde, possível promotor sigma54 -24/-12; Amarelo, promotor sigma70 -35/-10 já definido; Azul, possível sítio NtrC. O sítio de ligação de cAMP-CRP está marcado em itálico. Fonte: a autora.

O possível sítio de ligação do regulador transcricional NtrC e sítio de ligação de Sigma54 encontrados foram alinhados com suas respectivas sequências consenso (figura 18). Os dois sítios possuem bastante semelhança com suas sequências consenso e podem ser confirmados através de ensaios de ligação das proteínas ao DNA alvo.

A		
Sítio NtrC	TGCAC-N5-GTAATCA	
Consenso	TGCAC-N5-TGGTGCA	
B		
Sítio sigma54	GTGGCG-N6-TTGCG	
Consenso	CTGGCA-N6-TTGCA	

Figura 18. Comparações do sítio consenso de ligação das proteínas NtrC e sigma54 na região promotora do gene *rmf*. Sítio consenso para NtrC de *Salmonella typhimurium* (Ferro, Ames e Nikaido, 1985) e consenso para sigma54 de vários organismos (Barrios, Valderrama e Morett, 1999). Bases destacadas em cinza possuem nucleotídeos idênticos a sequência consenso. Fonte: a autora.

Um transcriptoma realizado por Conway e colaboradores em 2014 mostrou que o gene o *rmf* está localizado em uma região onde ocorre transcrição na fita positiva e negativa do DNA (Figura 19). Eles observaram que quando a célula está na fase estacionária a transcrição do gene *rmf* termina dentro do operon *ycbZ-fabA* (figura 19), gerando dessa forma um RNA complementar ao mRNA desse operon (Conway *et al.*, 2014). O RNA *antisense* gerado por esse tipo de arquitetura já foi relatado por alguns autores como sendo importante na regulação da transcrição (Behrens *et al.*, 2014; Chatterjee *et al.*, 2011). Além disso, já foi relatada a presença de 316 RNAs de fita dupla potencialmente funcionais em *E. coli* (Lybecker *et al.*, 2014). Ou seja, o RNA antisense *rmf/ycbz-fabA* gerado principalmente durante a fase estacionária poderia regular de alguma forma a transcrição/tradução do *rmf*.

O gene *fabA* codifica para a proteína 3-hidroxidecanoil-acil desidratase. Essa proteína está envolvida com o metabolismo de lipídios e é essencial para o crescimento celular. Ela é responsável pela introdução da insaturação *cis* nos ácidos graxos, função essa considerada essencial para a célula (necessária, por exemplo, para formação da membrana celular) (Cronan, Silbert e Wulff, 1972; Feng e Cronan,

2009). Já o gene *ycbZ* é ainda pouco estudado, mas um estudo de bioinformática que analisou interações genéticas em larga escala mostrou que ele possui interação genética com várias proteínas envolvidas com a tradução e biossíntese de ribossomos (Gagarinova *et al.*, 2016).

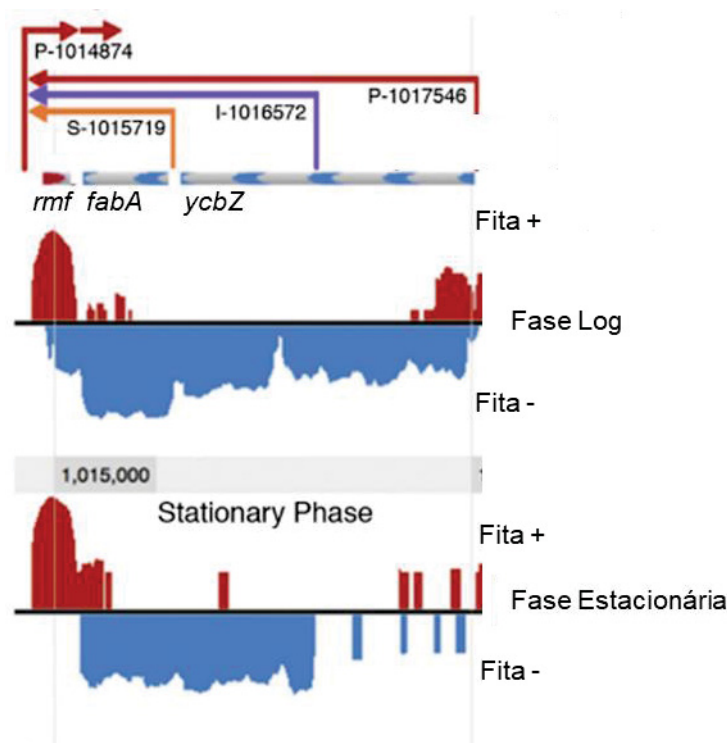


Figura 19. Características regulatórias da região *rmf*. Dados de RNA-seq da fita positiva (vermelho) e da fita negativa (azul) foram normalizados para comparação entre amostras da fase logarítmica e estacionária. Promotores primários e unidades transcritivas estão em vermelho e são indicados por flechas no sentido promotor-terminador, promotores secundários estão em laranja e promotores internos em roxo. Começando da esquerda: *rmf* é transcrito a partir do promotor primário e dependendo da condição de crescimento termina antes ou dentro do operon *ycbZ-fabA*, que possui um promotor primário a montante de *ycbZ*, um promotor dentro do *ycbZ* e um promotor secundário a montante de *fabA*. A transcrição do operon *ycbZ-fabA* também termina antes ou dentro do gene *rmf*. Fonte: adaptado de (Conway *et al.*, 2014)

Resumidamente, o gene *rmf* tem um promotor sigma70 já conhecido que é regulado por cAMP-CRP e possivelmente um promotor sigma54. Existe também um provável sítio de ligação de NtrC, e é possível que esse gene seja regulado através da geração de rnas *antisense* em alguns momentos celulares.

5.3.2 Ensaio *in vitro* de ligação entre as proteínas Sigma54 ou NtrC e a região promotora do gene *rmf* de *E. coli* (*Electrophoretic mobility shift assay* - EMSA)

A fim de avaliar se Sigma54 ou NtrC são capazes de se ligar à região promotora do gene *rmf* e assim validar o possível sítio de ligação de NtrC e o promotor sigma54 encontrado *in silico* e por análises de ChiP-seq, foram realizados ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (*Electrophoretic mobility shift assay* - EMSA). O ensaio de EMSA é amplamente utilizado no estudo de interações DNA-proteína. A técnica consiste em verificar a ocorrência de retardamento na migração de um fragmento de DNA pela sua associação à proteína de ligação afim. O complexo DNA-proteína é identificado quando comparado com a migração do DNA não ligado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. A proteína retarda a mobilidade do DNA quando ligada a ele, portanto, o DNA livre migrará mais rapidamente que o complexo DNA-proteína (Hellman e Fried, 2007)

Para a realização do ensaio de EMSA foi necessário obter a região promotora do gene *rmf* e as proteínas Sigma54 e NtrC purificadas. O plasmídeo comercial pUA66rmf (GE Healthcare) contendo a região promotora de interesse foi construído com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Portanto, as mesmas enzimas foram utilizadas para remover o gene deste plasmídeo e subclonar a região promotora do gene *rmf* no plasmídeo pUC19a. É importante ressaltar que as regiões clonadas nesses plasmídeos comerciais e que foram subclonadas em pUC19a compreendem mais que a região promotora, e sim a região intergênica inteira mais 50-150 pares de bases flanqueando as regiões codificadoras a montante e a justante.

Após a subclonagem, o fragmento foi sequenciado para confirmar a ausência de mutações. Essa clonagem deu origem ao plasmídeo pHSPrmf que contém a região promotora do gene *rmf*. O mesmo procedimento foi realizado em paralelo para a região promotora do gene *glnK* que será utilizada como controle positivo. A subclonagem do promotor *glnK* em pUC19a gerou o plasmídeo pHSPglnK.

Uma vez obtidos e confirmados os clones, os plasmídeos pHSPrmf e pHSPglnK foram utilizados como molde para PCR e os oligonucleotídeos iniciadores do próprio vetor pUC19a (denominados universal e reverso) foram utilizados para a obtenção do

produto. As condições testadas foram eficientes e geraram produtos de PCRs do tamanho esperado e sem bandas inespecíficas (figura 20).

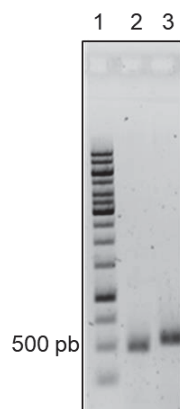


Figura 20. Eletroforese dos produtos de PCR das regiões promotoras dos genes *rmf* e *glnK*. Eletroforese em gel de agarose 1%. Corrida realizada em tampão TAE a 70 V por 50 minutos. Linha 1 – marcador molecular 1kb, linha 2 – produto de pcr do promotor do gene *glnK* (466 pb) e linha 3 – produto de pcr do promotor do gene *rmf* (506 pb). Fonte: a autora.

Os produtos das PCRs foram purificados utilizando-se kits e dosados no equipamento Nanodrop. Para garantir uma boa visualização do DNA no ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA), foi testada qual seria a concentração ideal a ser utilizada. Para isso, diferentes concentrações de DNA foram aplicadas em gel de poliácridamida nativo 4,5% que foi submetido a corrida eletroforética de forma similar à realizada no ensaio de EMSA. Após o DNA ser corado com brometo de etídeo, observou-se que 25 nM é concentração ideal de DNA que deve ser utilizada no ensaio (figura 21).

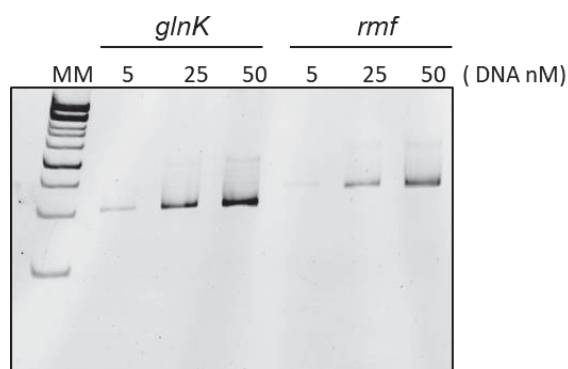


Figura 21. Avaliação da concentração ideal de DNA para uso no ensaio de EMSA. Diferentes concentrações de DNA foram aplicadas em gel de poliácridamida 4% e submetidos a 80 V durante 70 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo e revelado no sistema de imagem UVP. Fonte: a autora.

Uma vez obtidos os fragmentos de DNA necessários para a análise, foi realizada a purificação do fator Sigma54 e do regulador transcricional NtrC. A proteína Sigma54 de *E. coli* foi superexpressa a partir do plasmídeo da coleção ASKA, o qual expressa a proteína Sigma54 com cauda de histidina N-terminal. A cauda de histidina permitiu que a proteína fosse purificada em um único passo utilizando-se cromatografia de afinidade com uma coluna HiTrap chelating (GE Healthcare) (figura 22). Previamente á purificação, foi realizado um teste de expressão a 37 °C por 3 horas utilizando 0,5 mM de IPTG (figura 22A). Apesar de grande parte da proteína estar na fração insolúvel, obteve-se proteína em quantidade suficiente na fração solúvel para prosseguir com a purificação em maior escala.

A proteína foi eluída com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM utilizando-se gradiente linear de imidazol de 0,1 a 1,0 M e depois foi dialisada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 contendo NaCl 100 mM e glicerol 50% (figura 22B). A concentração de proteína obtida ao final da diálise foi de 1,07 µg/µL. A proteína foi alíquotada em microtubos e armazenada a -20°C.

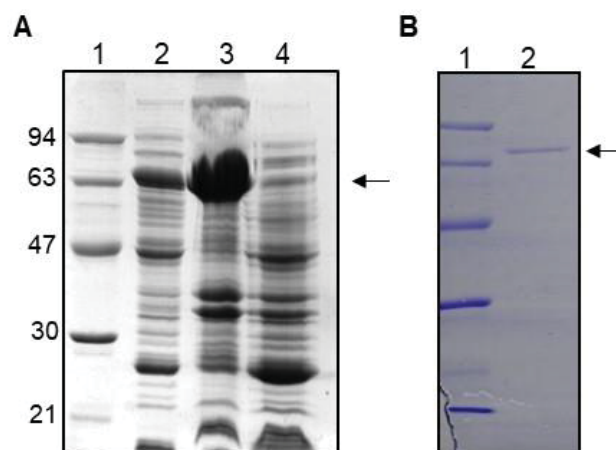


Figura 22. Purificação do fator Sigma54 de *E. coli*. (A) Teste de expressão do fator Sigma54 de *E. coli* a 37 °C durante 3 horas com 0,5 mM de IPTG. 1 - marcador de massa molecular (kDa), 2 - fração solúvel (sobrenadante), 3 - fração insolúvel (precipitado) e 4 - sem adição de IPTG. (B) Proteína purificada após diálise. 1 - marcador de massa molecular (kDa) e 2 - proteína purificada. Fonte: a autora.

A proteína NtrC de *E. coli* foi superexpressa a partir do plasmídeo da coleção ASKA que expressa NtrC com cauda de histidina N-terminal. A proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap chelating (GE Healthcare) (figura 23). NtrC foi eluída com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e KCl 150

mM utilizando gradiente linear de imidazol de 0,1 a 1 M e depois foi dialisada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo KCl 150 mM e glicerol 20% (figura 23B). A concentração de proteína obtida ao final das etapas foi de 0,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A proteína foi alíquotada em microtubos e armazenada a -20°C .

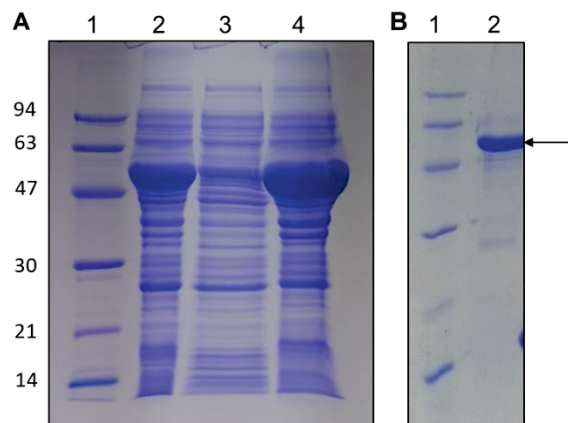


Figura 23. Purificação da proteína NtrC de *E. coli*. (A) Teste de expressão utilizando 0,5 mM de IPTG durante 3 h. 1 - marcador de massa molecular (kDa), 2 – extrato total, 3 - fração solúvel (sobrenadante) e 4 – fração insolúvel (precipitado). (B) Proteína purificada após diálise. 1 - marcador de massa molecular (kDa) e 2 - proteína purificada. Fonte: a autora.

Ensaio de interação DNA-proteína foram realizados e observou-se o surgimento de bandas com migração mais lenta à medida em que foram adicionadas concentrações crescentes da proteína Sigma54 ao promotor *rmf* e *glnK* (figura 24). Essas bandas correspondem à formação do complexo DNA-proteína, uma vez que a migração do DNA complexado é mais lenta em relação ao DNA livre. O surgimento de bandas intermediárias também pode ser visto, indicando possivelmente diferentes níveis de oligomerização (figura 24).

Para verificar a especificidade da formação do complexo, ou seja, se a proteína Sigma54 se ligaria a qualquer DNA presente na reação, foi realizado um ensaio com um fragmento de DNA que não possui promotor sigma54 (gene *glnB* de *E. coli* – gentilmente cedido pela Dra. Edileusa C. M. Gerhardt). Neste caso, não foi observada diferença na migração do DNA com a adição da proteína (figura 24). Desta forma, os ensaios de EMSA mostraram que a proteína Sigma54 de *E. coli* é capaz de se ligar às regiões promotoras do gene *rmf* e *glnK* (figura 24).

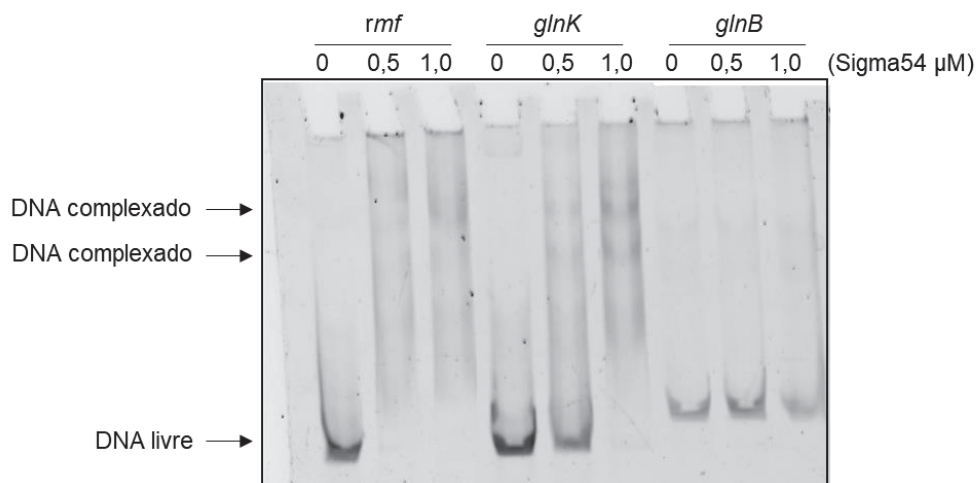


Figura 24. Ensaio de ligação da proteína Sigma54 à região promotora do gene *rmf*. Concentrações crescentes de sigma54 foram incubadas com os fragmentos das regiões promotoras dos genes *rmf* e *glnK* (controle positivo) e com o fragmento do gene *glnB* (controle negativo). As amostras foram analisadas em gel de poliácridamida não desnaturante 4,5%. Gel representativo de 3 experimentos independentes. Fonte: a autora,

Já o ensaio de EMSA (Eletrophoretic mobility shift assay) realizado com a proteína NtrC-P não conseguiu demonstrar a ligação da proteína ao seu possível sítio de ligação presente a montante do gene *rmf* (figura 25). A ligação de NtrC-P ao controle positivo *glnK* é observada pelo surgimento de bandas de migração mais lenta. Além disso, é possível que ocorra algum nível de ligação inespecífica da proteína ao DNA evidenciada pelo surgimento de bandas no poço do gel com o aumento da concentração de NtrC-P em todas as condições, fator esse também observado por Yoshida, Shimada e Ishihama, 2018.

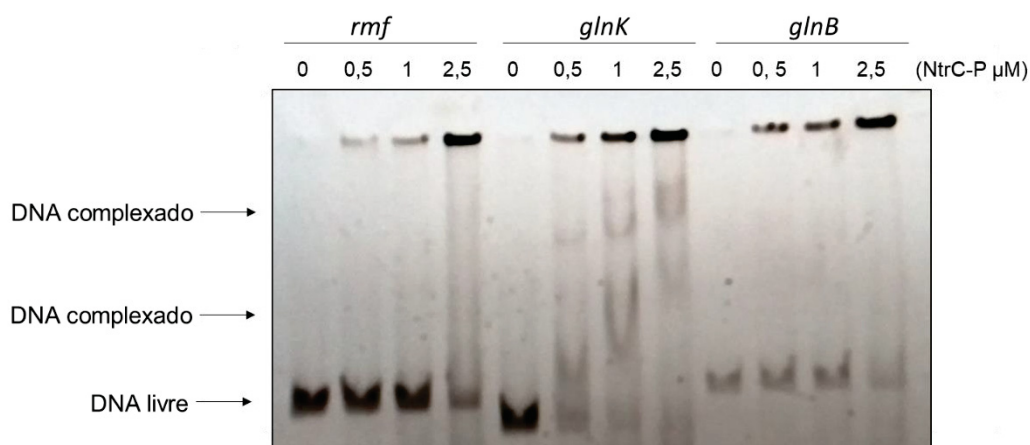


Figura 25. Ensaio de ligação da proteína NtrC-P à região promotora do gene *rmf*. Concentrações crescentes de NtrC-P foram incubadas com os fragmentos das regiões promotoras dos genes *rmf* e *glnK* (controle positivo) e com o fragmento do gene *glnB* (controle negativo). As amostras foram

analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5%. Gel representativo de 3 experimentos independentes. Fonte: a autora,

Portanto, pode-se dizer que o possível promotor sigma54 encontrado por análise de bioinformática a montante do gene *rmf* (figura 17 e 18) existe, já que Sigma54 foi capaz de se ligar à região promotora do gene. Já o sítio de ligação de NtrC não foi confirmado por esse ensaio. É possível que esse sítio seja de baixa afinidade, o que tornaria difícil a observação da ligação através de EMSA.

5.3.3 Ensaio *in vivo* utilizando a fusão promotor *rmf:gfp*.

Uma vez que a proteína Rmf estava 103x mais abundante na condição -NT1 quando comparada com a condição +N do proteoma, que o gene *rmf* possui um promotor sigma54 além do promotor sigma70 já descrito anteriormente (Yamagishi *et al.*, 1993) e que a fusão transcricional *rmf:gfp* não conseguiu detectar aumento na expressão de *rmf* em privação de nitrogênio, optou-se por realizar ensaios com estirpes de *E. coli* mutantes incapazes de expressar Sigma54, NtrC ou GlnB transformadas com a fusão *rmf:gfp*. Essas proteínas são importantes na adaptação da célula a privação de nitrogênio e parecem estar ligadas à regulação do gene *rmf*. Com esse ensaio é possível avaliar o efeito de cada uma delas na expressão do gene *rmf* através do repórter GFP.

Os ensaios foram realizados com as estirpes de *E. coli* selvagem (BW25113), e os mutantes $\Delta rpoN$ (JW3169-1, Sigma54) e $\Delta glnG$ (JW3839-2, NtrC) derivados da BW25113, todos provenientes da Keio collection (Baba *et al.*, 2006). Essas células foram transformadas com o plasmídeo que expressa a fusão promotor *rmf:gfp* (pUA66rmf). Como esse plasmídeo possui resistência ao antibiótico canamicina e os mutantes Keio foram construídos com inserção de cassete de canamicina (Baba *et al.*, 2006), previamente ao ensaio *in vivo*, foi necessário fazer a retirada do cassete dos mutantes para que eles perdessem a resistência e mantivessem o plasmídeo puA66rmf na célula.

A retirada do cassete dos mutantes foi realizada com o auxílio da FLP recombinase (expressa a partir do plasmídeo pCP20 - Amp^R) conforme descrito no item 4.18 de materiais e métodos. Foi verificada a eficiência da técnica através de

plaqueamento das células em meio contendo canamicina (ausência de crescimento indica que a célula perdeu o cassete), em meio contendo ampicilina (ausência de crescimento indica que a célula perdeu o plasmídeo pCP20 que expressa a recombinase) e por último em meio sem antibiótico para checar a viabilidade celular. Como as células não foram capazes de crescer na presença de canamicina e ampicilina e foram capazes de crescer na ausência de antibióticos, a retirada do cassete foi realizada com sucesso (figura 26).

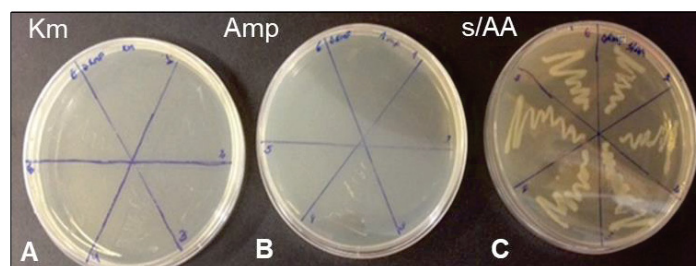


Figura 26. Retirada do cassete de Canamicina dos mutantes Keio através da FLP recombinase. Imagem do teste de crescimento em meio LA contendo os antibióticos indicados da estirpe de *E. coli* mutante *rpoN*. A - Célula não foi capaz na presença de canamicina indicando perda do cassete. B – Célula não foi capaz de crescer na presença de ampicilina indicando perda do plasmídeo pCP20. C – Célula foi capaz de crescer em meio LA sem antibiótico confirmando a viabilidade celular. Imagem representativa da retirada do cassete dos mutantes $\Delta rpoN$, $\Delta glnB$, $\Delta glnG$. Fonte: a autora.

A retirada do cassete de canamicina da estirpe mutante *rpoN* também foi confirmada através da reação de pcr utilizando os primers EcRpoN mutant check foward (5'-CGGCACGCCTACAGAAATCT-3') e reverse (5'-GATTCGGTCAAATATTGCTCAAG-3') (figura 27).

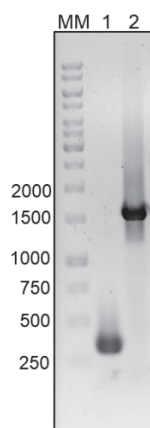


Figura 27. Confirmação da deleção do cassete de Canamicina do mutante *rpoN* por PCR. A reação de PCR foi realizada com (1) a estirpe mutante *rpoN* submetida à retirada do cassete e (2) com a estirpe mutante *rpoN*. Um fragmento correspondente à cicatriz de remoção do cassete de

aproximadamente 300 pb é visualizado na linha 1. Na linha 2 é observado um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases, correspondente ao cassete de Canamicina. Fonte: a autora.

As estirpes de *E. coli* selvagem e mutantes que perderam a resistência à canamicina foram transformadas com o plasmídeo pUA66rmf (km^R) e cultivadas de maneira similar ao cultivo realizado para o ensaio de proteoma, com a diferença da utilização do antibiótico canamicina para a manutenção do plasmídeo.

Após a coleta das células nos tempos e condições pré-determinados (+N, -NT1 e -NT2), as células foram preparadas para análise por citometria de fluxo para avaliar a atividade do promotor *rmf* através dos níveis de GFP acumulados como descrito no item 4.15. A estirpe de *E. coli* selvagem BW25113 não apresentou diferença significativa na expressão do promotor *rmf* sob os diferentes regimes de nitrogênio e tempo de exposição (figura 28, A), ou seja, embora a proteína Rmf tenha sido encontrada 103x mais expressa na condição -NT1, os dados de expressão do gene *rmf* não correspondem aos dados de expressão proteica, assim como ocorreu com a estirpe de *E. coli* MG1655 (figura 16).

Os ensaios com as estirpes mutantes *rpoN* e *glnG* revelaram uma diferença significativa na atividade do promotor *rmf* (figura 28, B e C). A ausência de Sigma54 ou NtrC fez aumentar a expressão de *rmf* durante a privação de nitrogênio. Esse dado mostra que de alguma forma Sigma54 e NtrC estão envolvidos na regulação de *rmf*.

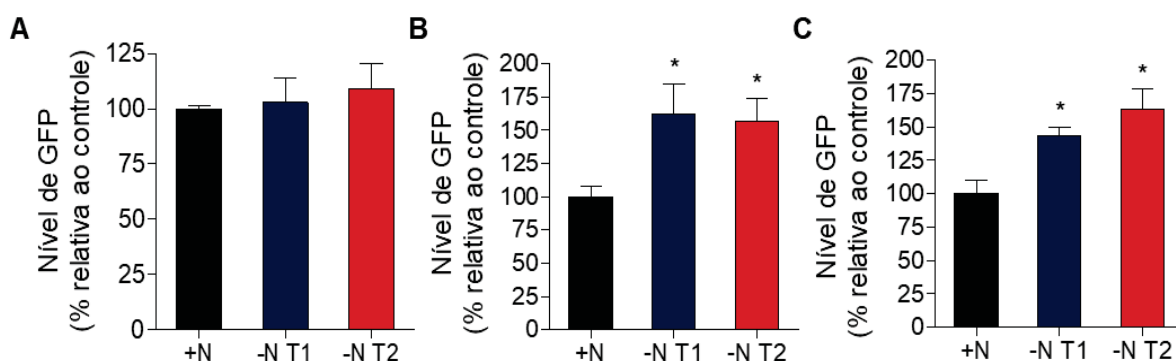


Figura 28. Ensaio de citometria de fluxo do promotor *rmf:gfp* com as estirpes de *E. coli* selvagem e mutantes. Ensaio realizado em meio mínimo M9 contendo 30 mM NH_4Cl (+N) ou 3 mM de NH_4Cl (-N). A condição -NT1 foi coletada após 30 minutos em privação de nitrogênio e -NT2 após 60 minutos de privação de nitrogênio. (A) *E. coli* selvagem BW25113; (B) *E. coli* $\Delta rpoN$; (C) *E. coli* $\Delta glnG$. Ensaio realizado em triplicata biológica. Barras representam o desvio padrão. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) das condições -N em relação a condição +N. Fonte: a autora.

Como houve um aumento de expressão do promotor *rmf* na ausência de sigma54 e NtrC é possível que estas proteínas exerçam um efeito negativo sobre a expressão de *rmf*. Assim, seria esperado que um aumento na concentração das proteínas sigma54 e NtrC causasse o efeito inverso, diminuindo a expressão de *rmf*. Então, foi realizado um ensaio em que se aumentou a expressão de NtrBC através do plasmídeo pLHBCTZ, que expressa as proteínas NtrB e NtrC de *Azospirillum brasilense* na presença da fusão *rmf:gfp*. Este ensaio foi realizado em meio LB sem adição do indutor de expressão IPTG (usada expressão basal do plasmídeo), devido à dificuldade da célula contendo os dois plasmídeos (fusão *rmf:gfp* e de expressão do par NtrBC) de crescer em meio mínimo M9. Os dados observados indicam que na presença de uma maior concentração de NtrBC ocorre uma menor expressão do promotor *rmf* (figura 29).

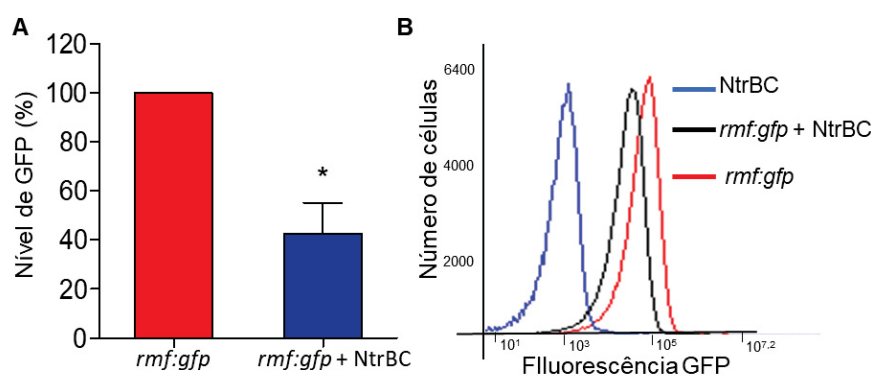


Figura 29. Expressão da fusão transcional promotor *rmf:gfp* na presença de NtrBC de *A. brasilense*. Ensaio realizado em meio LB. A) Nível de fluorescência da GFP na célula transformada apenas com o plasmídeo que contém a fusão *rmf:gfp* e na célula transformada com o plasmídeo que contém a fusão *rmf:gfp* + plasmídeo que expressa NtrBC. Fluorescência do tratamento *rmf:gfp* corresponde a 100%. B) Histograma de fluorescência de *E. coli* mostrando os níveis de fluorescência de GFP da célula transformada apenas com o plasmídeo que expressa NtrBC (fluorescência basal), da célula expressando a fusão *rmf:gfp* e da célula contendo os dois plasmídeos que expressam *rmf:gfp* e NtrBC. Ensaio realizado em duplicata. * indica diferença estatística ($p < 0,05$). Fonte: a autora.

Em conjunto, os ensaios *in vivo* indicam que NtrC e Sigma54 têm um efeito negativo na expressão do gene *rmf*. Essa diminuição pode ocorrer devido a um efeito direto ou global dessas duas proteínas. No caso do Sigma54, o ensaio de EMSA confirmou a ligação dessa proteína ao promotor *rmf* (figura 24), dando evidências de que essa regulação pode ser devido a um efeito direto dessa ligação. Mais ensaios precisam ser realizados para conseguir elucidar o mecanismo de regulação do *rmf*.

6 DISCUSSÃO

Alguns estudos sugerem que *E. coli* responde a privação de nutrientes através da expressão/ativação de proteínas que permitem o uso de fontes alternativas e, quando essa primeira resposta não é mais suficiente, a célula entra em um estado de dormência (Martin *et al.*, 1989; Peterson, Mandel e Silhavy, 2005). A dinâmica proteômica de *E. coli* encontrada neste trabalho está de acordo com essas afirmações. Durante a fase inicial de privação de nitrogênio (-NT1), a maior adaptação proteômica da célula foi a ativação de NtrC agindo como a primeira linha de defesa da célula contra a falta de nitrogênio (figura 9), confirmando a análise de microarranjo feita por Zimmer *et al.*, 2000. O aumento da expressão de genes dependentes de NtrC-P neste estágio está correlacionado com o aumento da uridililação de GlnB (figura 8).

Uma consequência notável na fase de adaptação inicial à privação de nitrogênio foi a superprodução da proteína Rmf. Esta indução não foi detectada na condição -NT2 e, portanto, foi transiente. A proteína Rmf age somente no estágio inicial da inativação dos ribossomos através da formação de dímeros de ribossomo inativo 90S (Yamagishi *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 2002). A proteína Hpf (fator promotor de hibernação) que estava 6,3x mais abundante na condição -NT2 (tabela 3, apêndice 1), liga o dímero de ribossomo inativo 90S promovendo sua estabilização e formando o ribossomo 100S (Ueta *et al.*, 2005, 2008) (figura 13). A cascata de inativação do ribossomo pode explicar por que a indução de Rmf ocorre somente de forma transiente.

O promotor *rmf* já foi estudado. Ele possui um sítio de ligação sigma70 fraco (Yamagishi *et al.*, 1993) que é ativado por ppGpp (Izutsu, Wada e Wada, 2001) e por cAMP-CRP (Shimada, Yoshida e Ishihama, 2013). O acúmulo de ppGpp devido à limitação de aminoácidos durante a transição para uma condição de privação de nitrogênio, pode explicar, pelo menos em parte, a indução observada de Rmf em -NT1 (tabela 2). NtrC ativa a transcrição do gene *relA* em uma situação de limitação de nitrogênio. Assim sendo, o aumento de produção de ppGpp por RelA pode ligar a atividade de NtrC à indução de Rmf em -NT1. Entretanto, a indução de RelA devido à privação de nitrogênio é modesta (2,2x) (Brown *et al.*, 2014). RelA não foi encontrada

induzida em -NT1 (-0,96x, $p = 0,95$) e foi induzida de forma discreta em -NT2 (1,5x, $p = 0,05$). Por isso, especula-se que o acúmulo de ppGpp está mais relacionado com a adaptação observada em -NT2 que em -NT1. De fato, a enzima GppA, que converte (p)ppGpp ao modulador da resposta estringente ppGpp (Mechold *et al.*, 2013), estava 3,2 x mais induzida em -NT2 (apêndice 1).

O ensaio de EMSA mostrou que o gene *rmf* possui promotor sigma54 (figura 24). Esse promotor já havia sido detectado através de análise de bioinformática realizada no genoma de *E. coli* (Reitzer e Schneider, 2001) e também por análise de ChiP-Seq (Bonocora *et al.*, 2015). Para iniciar a transcrição a partir de promotores sigma54, a Holoenzima RNA Polimerase sigma54 necessita de uma proteína ativadora de transcrição da família AAA+ (*ATPases associated with various cellular activities*), conhecidas como bEBPs (*bacterial enhancer binding proteins*). Essas proteínas hidrolisam ATP e promovem a abertura da fita de DNA permitindo a transcrição (Bush e Dixon, 2012; Zhang *et al.*, 2016).

A proteína NtrC é uma bEBP. Como a maioria dos genes induzidos em -NT1 são sigma54 e NtrC dependentes (tabela 2) e a análise de bioinformática detectou um provável sítio de ligação de NtrC na região promotora do gene *rmf* (figura 17 e 18), ele seria um candidato para regular esse promotor. Embora o ensaio de EMSA não tenha conseguido detectar ligação de NtrC é possível que esse sítio seja de baixa afinidade, tal que não permitiu observar a ligação da proteína ao DNA-alvo a partir desta técnica. A localização incomum do sítio de ligação de NtrC (a justante do promotor sigma54) pode ser um indício de que ele não se ligue com a finalidade de permitir a abertura da fita para a Holoenzima RNA Polimerase sigma54, mas sim para regular a ativação desse gene através de ligação direta por exemplo.

Os ensaios *in vivo* apontaram que a ausência de Sigma54 ou NtrC causam um aumento na expressão do gene *rmf* (figura 28). Este dado levou à hipótese de que Sigma54 e/ou NtrC possam se ligar à região promotora, entretanto sem ativar a expressão do gene *rmf* e que essa ligação poderia bloquear a ação da Holoenzima RNA Polimerase Sigma70 estericamente, impedindo também a ativação do *rmf* a partir desse promotor (figura 30).

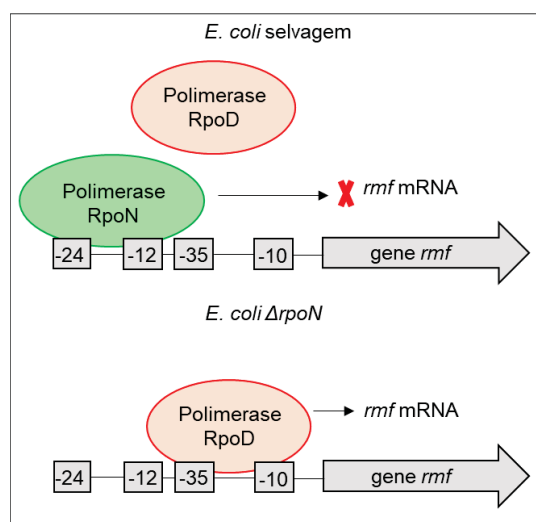


Figura 30. Hipótese de regulação do promotor *rmf*. A Holoenzima RNA Polimerase RpoN (Sigma54) se liga a região promotora sigma54 (-24/-12) mas não é capaz de transcrever mRNA. Essa ligação impede que a Holoenzima RNA polimerase RpoD (ou Sigma70) se ligue e consiga transcrever o gene *rmf*. Na estirpe mutante *rpoN*, a Holoenzima RNA polimerase RpoD se liga aos sítios -35/-10 e promove a transcrição do *rmf*. Fonte: a autora.

De outro lado, essa regulação pode ocorrer de forma indireta a um nível global de regulação celular devido à ausência de Sigma54 e NtrC. Mais estudos precisam ser feitos para se conseguir elucidar a regulação do gene *rmf*.

Há muito tempo se reconhece que, sob condições limitantes de nutrientes, *E. coli* entra em um modo de dormência (Matin *et al.*, 1989; Peterson, Mandel e Silhavy, 2005). No ensaio realizado, observou-se que a privação prolongada de nitrogênio para o crescimento (figura 6) e os dados do proteoma revelaram que essa parada se relaciona com: 1) acúmulo de proteínas envolvidas na condensação do DNA, RNA, catabolismo de proteína e hibernação do ribossomo e 2) redução nos níveis de proteínas envolvidas na replicação do DNA, síntese de parede celular, síntese de coenzima e produção de ATP. Coletivamente, essas mudanças resultarão em uma célula metabolicamente menos ativa que são capaz de apresentar tolerância a múltiplas drogas (figura 12).

Células bacterianas que são recalcitrantes ao tratamento por antibióticos são conhecidas como persistentes (Lewis, 2010; Maisonneuve *et al.*, 2014). A limitação de nutriente associada ao cessar do crescimento favorecem o aparecimento de células persistentes (Balaban, 2011), que são uma subpopulação fenotipicamente distinta de bactérias que provavelmente surge de eventos estocásticos (Maisonneuve

et al., 2014). Em muitos casos o surgimento de células persistentes é dependente dos pares toxina-antitoxina (Gerdes e Maisonneuve, 2012). A indução de proteínas que bloqueiam a tradução, como a RelE e Rmf, em resposta a limitação de nitrogênio é conhecida por promover tolerância a drogas e a formação de células persistentes (Keren *et al.*, 2004). Em uma busca na literatura, não foram encontradas informações sobre a formação de células persistentes em resposta à limitação de amônio e os dados relatados aqui sugerem que este pode ser um campo a ser explorado por outros estudos.

Uma questão que permanece elusiva é qual o sinal que as células em privação de nitrogênio utilizam para ocorrer a mudança na busca por fontes alternativas de nitrogênio (-NT1) para a fase estacionária ou estado de dormência (-NT2). Tem sido reconhecido que a Holoenzima RNA Polimerase Sigma38 atua como regulador central para a entrada na fase estacionária quando as células estão em uma condição de privação de vários nutrientes (Gyaneshwar *et al.*, 2005). A regulação do acúmulo de RpoS (Sigma38) é complexa e submetida a um circuito regulatório que inclui regulação da transcrição, tradução, estabilidade da proteína e atividade (Battesti, Majdalani e Gottesman, 2011). Já que a privação de carbono rapidamente aumenta os níveis de RpoS favorecendo a transcrição de genes RpoS dependentes, a privação por nitrogênio tem menor efeito nos níveis de RpoS (Mandel e Silhavy, 2005), o que é confirmado pelos dados do proteoma e também pela quantificação de mRNA *rpoS* (Figueira, Brown, Ferreira, Eldridge, Burchell, Pan, *et al.*, 2015).

Dado que os genes que necessitam apenas de RpoS para sua transcrição ainda são indeterminados (Battesti, Majdalani e Gottesman, 2011), é impossível traçar uma correlação dos efeitos diretos específicos de RpoS nas adaptações observadas em -NT2. Mesmo assim, os genes classificados como RpoS dependentes estão entre os induzidos em -NT2 (apêndice 1), sugerindo que a atividade de RpoS pode ter um papel na adaptação em uma condição de privação de nitrogênio prolongada.

Pequenas moléculas podem afetar significativamente a expressão de genes. A privação de nitrogênio prolongada resultou em escassez de aminoácidos e, assim, na ativação de RelA. O consequente acúmulo de ppGpp afeta a expressão de numerosos genes (Hauryliuk *et al.*, 2015). A escassez de aminoácidos também pode afetar a atividade da proteína Lrp (*leucine-regulatory protein*)(Newman e Lin, 1995). Ainda, a

expressão alterada dos genes *ilv*, que respondem a Lrp, foi observada em -NT2. Efeito nos níveis de cAMP também podem ocorrer em resposta à privação de nitrogênio e afetar outros genes regulados por CRP.

Outro fator a se considerar é a flutuação nos níveis intracelulares de poliaminas. A indução da via de catabolismo de putrescina durante a privação de nitrogênio (tabela 2) pode afetar o acúmulo das proteínas pertencentes ao “poliaminas modulon” (Terui *et al.*, 2010). A privação de nitrogênio também pode afetar significativamente os regulons Fur e Zur (apêndice 2) presumivelmente devido a redução na demanda de microelementos durante a privação de nitrogênio. Essa parece ser a primeira conexão entre privação de nitrogênio e a atividade de microelementos.

7 CONCLUSÃO

- A exposição de *E. coli* à privação de nitrogênio durante 30 minutos (resposta inicial) alterou significativamente o acúmulo de 23 proteínas, dentre essas, 17 são reguladas por NtrC;
- *E. coli* exposta a uma privação prolongada de nitrogênio (60 minutos, resposta tardia) alterou significativamente o acúmulo de 409 proteínas das 2103 analisadas;
- A reprogramação celular mais ampla que ocorre após 60 minutos em privação de nitrogênio foi capaz de promover a entrada de *E. coli* em um estado de dormência, que pode torna-la resistente a múltiplas formas de estresse;
- A proteína Rmf parece ser um fator importante para a célula durante a transição de uma condição de alto nitrogênio para uma condição de baixo nitrogênio, uma vez que ela foi encontrada 103x mais expressa na condição -NT1;
- O gene *rmf* possui promotor sigma54 e as proteínas Sigma54 e NtrC de alguma forma são capazes de regular sua expressão.

REFERÊNCIAS

A MATIN; E A AUGER; P H BLUM, A.; SCHULTZ, J. E. Genetic Basis of Starvation Survival in Nondifferentiating Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, 1989.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, mar. 2003.

AGAFONOV, D. E.; KOLB, V. A.; NAZIMOV, I. V; SPIRIN, A. S. A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12345–9, 26 out. 1999.

AGAFONOV, D. E.; KOLB, V. A.; SPIRIN, A. S. Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. **EMBO reports**, v. 2, n. 5, p. 399–402, maio 2001.

ALMIRÓN, M.; LINK, A. J.; FURLONG, D.; KOLTER, R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. **Genes & development**, v. 6, n. 12B, p. 2646–54, dez. 1992.

ALTELAAR, A. F. M.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. R. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 35–48, 4 jan. 2013.

AMANDA WILCZEK. **Identificação in silico de sítios de ligação à proteína regulatória NtrC em sequências genômicas.** [s.l.] UFPR, 2019.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 80–105, mar. 2001.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28288–93, 11 nov. 1994.

ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 301–313, 1 abr. 1999.

BABA, T.; ARA, T.; HASEGAWA, M.; TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; BABA, M.; DATSENKO, K. A.; TOMITA, M.; WANNER, B. L.; MORI, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular systems biology**, v. 2, p. 2006.0008, 2006.

BALABAN, N. Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 21, n. 6, p. 768–775, 2011.

BANTSCHIEFF, M.; LEMEER, S.; SAVITSKI, M. M.; KUSTER, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 4, p. 939–965, 8 set. 2012.

BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. **Compilation and analysis of σ σ σ σ 54-dependent promoter sequences** *Nucleic Acids Research*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www3.ncbi.nlm.gov>>. Acesso em: 1 maio. 2019.

BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 189–213, 2011.

BEHRENS, S.; WIDDER, S.; MANNALA, G. K.; QING, X.; MADHUGIRI, R.; KEFER, N.; MRAHEIL, M. A.; RATTEI, T.; HAIN, T. Ultra Deep Sequencing of *Listeria monocytogenes* sRNA Transcriptome Revealed New Antisense RNAs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e83979, 3 fev. 2014.

BLATTNER, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5331, p. 1453–62, 5 set. 1997.

BLOOM, F. R.; LEVIN, M. S.; FOOR, F.; TYLER, B. Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. **Journal of bacteriology**, v. 134, n. 2, p. 569–77, maio 1978.

BONOCORA, R. P.; SMITH, C.; LAPIERRE, P.; WADE, J. T. Genome-Scale Mapping of *Escherichia coli* σ 54 Reveals Widespread, Conserved Intragenic Binding. **PLoS genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005552, out. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BROMBACHER, E.; DOREL, C.; ZEHNDER, A. J. B.; LANDINI, P. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 2847–2857, 1 out. 2003.

BROWN, D. R.; BARTON, G.; PAN, Z.; BUCK, M.; WIGNESHWERARAJ, S. Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia coli*. **Nature communications**, v. 5, n. May, p. 4115, 2014.

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. **Modulation of Glutamine Synthetase Adenylation and Deadenylation Is Mediated by Metabolic Transformation of the PI,-Regulatory Protein (E. coli/protein-bound uridine nucleotide/adenylyltransferase/2-oxoglutarate/cascade regulation)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC389567/pdf/pnas00087-0052.pdf>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

BUSH, M.; DIXON, R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ_{54} -dependent transcription. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 76, n. 3, p. 497–529, set. 2012.

CARNEIRO, S.; LOURENÇO, A.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. **Stringent response of *Escherichia coli*: revisiting the bibliome using literature mining** **Microbial Informatics and Experimentation**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.microbialinformaticsj.com/content/1/1/14>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

CASHEL, M.; KALBACHER, B. The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. V. Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. **The Journal of biological chemistry**, v. 245, n. 9, p. 2309–18, 10 maio 1970.

CHAIT, B. T. CHEMISTRY: Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? **Science**, v. 314, n. 5796, p. 65–66, 6 out. 2006.

CHATTERJEE, A.; JOHNSON, C. M.; SHU, C.-C.; KAZNESSIS, Y. N.; RAMKRISHNA,

D.; DUNNY, G. M.; HU, W.-S. Convergent transcription confers a bistable switch in *Enterococcus faecalis* conjugation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 23, p. 9721–6, 7 jun. 2011.

CHATTERJI, D.; KUMAR OJHA, A. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 160–165, 1 abr. 2001.

CHEREPANOV, P. P.; WACKERNAGEL, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. **Gene**, v. 158, n. 1, p. 9–14, 1 jan. 1995.

CHRISTENSEN, S. K.; MIKKELSEN, M.; PEDERSEN, K.; GERDES, K. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 25, p. 14328–14333, 2001.

CONWAY, T. *et al.* Unprecedented High-Resolution View of Bacterial Operon Architecture Revealed by RNA Sequencing. 2014.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, v. 130, n. 3, p. 395–8, 10 ago. 2007.

____. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–1372, 30 dez. 2008.

COX, J.; NEUHAUSER, N.; MICHALSKI, A.; SCHELTEMA, R. A.; OLSEN, J. V.; MANN, M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1794–1805, abr. 2011.

CRONAN, J. E.; SILBERT, D. F.; WULFF, D. L. **Mapping of the fabA Locus for Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Escherichia coli** **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC251398/pdf/jbacter00354-0226.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 6 jun. 2000.

ENGLISH, B. P.; HAURYLIUK, V.; SANAMRAD, A.; TANKOV, S.; DEKKER, N. H.; ELF, J. Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 31, p. E365-73, 2 ago. 2011.

FEKLÍSTOV, A.; SHARON, B. D.; DARST, S. A.; GROSS, C. A. Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 357–376, 8 set. 2014.

FENG, Y.; CRONAN, J. E. Escherichia coli Unsaturated Fatty Acid Synthesis COMPLEX TRANSCRIPTION OF THE *fabA* GENE AND IN VIVO IDENTIFICATION OF THE ESSENTIAL REACTION CATALYZED BY FabB * □ S. 2009.

FERRO, G.; AMES, -LUZZI; NIKAIDO, K. **Nitrogen regulation in Salmonella typhimurium. Identification of an ntrC protein-binding site and definition of a consensus binding sequence** **EMBO Journal**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC554219/pdf/emboj00267-0254.pdf>>. Acesso em: 1 maio. 2019.

FIGUEIRA, R.; BROWN, D. R.; FERREIRA, D.; ELDRIDGE, M. J. G.; BURCHELL, L.; PAN, Z.; *et al.* Adaptation to sustained nitrogen starvation by Escherichia coli requires the eukaryote-like serine/threonine kinase YeaG. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17524, 1 dez. 2015.

FIGUEIRA, R.; BROWN, D. R.; FERREIRA, D.; ELDRIDGE, M. J. G.; BURCHELL, L.; PAN, Z.; HELAINE, S.; WIGNESHWERARAJ, S. Adaptation to sustained nitrogen starvation by Escherichia coli requires the eukaryote-like serine/threonine kinase YeaG. **Scientific reports**, v. 5, p. 17524, 2015.

FINKEL, S. E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 113–120, fev. 2006.

FRISCH, R. L.; BENDER, R. A. Expanded role for the nitrogen assimilation control protein in the response of Klebsiella pneumoniae to nitrogen stress. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 4812–20, out. 2010.

GAAL, T.; ROSS, W.; ESTREM, S. T.; NGUYEN, L. H.; BURGESS, R. R.; GOURSE, R. L. Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase.

Molecular Microbiology, v. 42, n. 4, p. 939–954, 1 nov. 2001.

GAGARINOVA, A. *et al.* Systematic Genetic Screens Reveal the Dynamic Global Functional Organization of the Bacterial Translation Machinery. **Cell reports**, v. 17, n. 3, p. 904–916, 11 out. 2016.

GENTRY, D. R.; HERNANDEZ, V. J.; NGUYEN, L. H.; JENSEN, D. B.; CASHEL, M. **Synthesis of the Stationary-Phase Sigma Factor σ^{54} Is Positively Regulated by ppGpp.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC206978/pdf/jbacter00066-0244.pdf>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

GERDES, K.; MAISONNEUVE, E. Bacterial Persistence and Toxin-Antitoxin Loci. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 103–123, 2012.

GYANESHWAR, P.; PALIY, O.; MCAULIFFE, J.; JONES, A.; JORDAN, M. I.; KUSTU, S. Lessons from *Escherichia coli* genes similarly regulated in response to nitrogen and sulfur limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 9, p. 3453–8, 1 mar. 2005.

HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSÉN, A.; NORMARK, S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. **Molecular microbiology**, v. 18, n. 4, p. 661–70, nov. 1995.

HAN, M.-J.; LEE, S. Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 70, n. 2, p. 362–439, jun. 2006.

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, 8 abr. 2015.

HEESWIJK, W. C. VAN; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. **An alternative P_{II} protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*.** **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 133–146, 31 jul. 1996.

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 : MMBR**, v. 77, n. 4, p. 628–95, dez. 2013.

HELLMAN, L. M.; FRIED, M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1849–61, 2007.

HELMANN, J. D.; CHAMBERLIN, M. J. STRUCTURE AND FUNCTION OF BACTERIAL SIGMA FACTORS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 839–872, 28 jun. 1988.

HUERGO, L. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. [s.l.] UFPR, 2006.

HUERGO, L. F. *et al.* P(II) signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 251–83, mar. 2013.

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, 30 dez. 2015.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 1, p. 33–40, 1 jun. 2003.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 39–51, 1 jan. 2010.

ISHIHAMA, A. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. **Genes to Cells**, v. 4, n. 3, p. 135–143, 1999.

IZUTSU, K.; WADA, A.; WADA, C. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. **Genes to Cells**, v. 6, n. 8, p. 665–676, 2001.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex

formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530–8, 5 mar. 2004.

JIANG, P.; ATKINSON, M. R.; SRISAWAT, C.; SUN, Q.; NINFA, A. J. Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of Escherichia coli nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. **Biochemistry**, v. 39, n. 44, p. 13433–13449, 2000.

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 alpha-ketoglutarate. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4133–4146, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of Escherichia coli nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1906–11, mar. 1999a.

____. Regulation of autophosphorylation of Escherichia coli nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1906–11, mar. 1999b.

KACZANOWSKA, M.; RYDÉN-AULIN, M. Ribosome Biogenesis and the Translation Process in Escherichia coli. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 71, n. 3, p. 477–494, 2007.

KARP, P. D.; RILEY, M.; PALEY, S. M.; PELLEGRINI-TOOLE, A.; KRUMMENACKER, M. EcoCyc: Encyclopedia of Escherichia coli genes and metabolism. **Nucleic acids research**, v. 26, n. 1, p. 50–3, 1 jan. 1998.

KARZAI, A. W.; SUSSKIND, M. M.; SAUER, R. T. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). **The EMBO journal**, v. 18, n. 13, p. 3793–9, 1 jul. 1999.

KEREN, I.; SHAH, D.; SPOERING, A.; KALDALU, N.; LEWIS, K. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 8172–8180, 15 dez. 2004.

KITAGAWA, M.; ARA, T.; ARIFUZZAMAN, M.; IOKA-NAKAMICHI, T.; INAMOTO, E.; TOYONAGA, H.; MORI, H. Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA

library (A Complete Set of E. coli K-12 ORF Archive): Unique Resources for Biological Research. **DNA Research**, v. 12, n. 5, p. 291–299, 9 jan. 2006.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in Escherichia coli is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. **Genes & development**, v. 8, n. 13, p. 1600–12, 1 jul. 1994.

LEDERBERG, J.; TATUM, E. L. Gene recombination in Escherichia coli. **Nature**, v. 158, n. 4016, p. 558, 19 out. 1946.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 349–377, 26 out. 2007.

LEWIS, K. Persister Cells. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 64, p. 357–72, 2010.

LUIJSTERBURG, M. S.; NOOM, M. C.; WUITE, G. J. L.; DAME, R. T. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: A molecular perspective. **Journal of Structural Biology**, v. 156, n. 2, p. 262–272, nov. 2006.

LYBECKER, M.; ZIMMERMANN, B.; BILUSIC, I.; TUKHTUBAEVA, N.; SCHROEDER, R. The double-stranded transcriptome of Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 3134–3139, 25 fev. 2014.

MACIAG, A.; PEANO, C.; PIETRELLI, A.; EGLI, T.; BELLIS, G. DE; LANDINI, P. In vitro transcription profiling of the σ S subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the σ S regulon and identification of σ S-specific promoter sequence elements. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 13, p. 5338–55, jul. 2011.

MAISONNEUVE, E. *et al.* Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. **Cell**, v. 157, n. 3, p. 539–48, 24 abr. 2014.

MAKI, Y.; YOSHIDA, H.; WADA, A. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. **Genes to Cells**, v. 5, n. 12, p. 965–974, 1 dez. 2000.

MANDEL, M. J.; SILHAVY, T. J. Starvation for Different Nutrients in *Escherichia coli* Results in Differential Modulation of RpoS Levels and Stability. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 434–442, 15 jan. 2005.

MARSCHALL, C.; LABROUSSE, V.; KREIMER, M.; WEICHART, D.; KOLB, A.; HENGGE-ARONIS, R. Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on σ S and requires activation by cAMP-CRP. **Journal of Molecular Biology**, v. 276, n. 2, p. 339–353, 1998.

MCHUGH, J. P.; RODRIGUEZ-QUINONES, F.; ABDUL-TEHRANI, H.; SVISTUNENKO, D. A.; POOLE, R. K.; COOPER, C. E.; ANDREWS, S. C. Global Iron-dependent Gene Regulation in *Escherichia coli*: A NEW MECHANISM FOR IRON HOMEOSTASIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29478–29486, 8 ago. 2003.

MECHOLD, U.; POTRYKUS, K.; MURPHY, H.; MURAKAMI, K. S.; CASHEL, M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 12, p. 6175–89, jul. 2013.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. **Nitrogen Control in Bacteria** **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239390/pdf/590604.pdf>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

METZNER, M.; GERMER, J.; HENGGE, R. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex σ S-dependent *csiD-ygaF-gabDTP* operon in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 799–811, 15 dez. 2003.

MIKA, F.; HENGGE, R. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of S (RpoS) in *E. coli*. 2005.

NAIR, S.; FINKEL, S. E. Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 13, p. 4192–4198, 1 jul. 2004.

NAVARRO LLORENS, J. M.; TORMO, A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, E. Stationary phase in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 476–495, 1 jul. 2010.

NEUBAUER, C.; GILLET, R.; KELLEY, A. C.; RAMAKRISHNAN, V. Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. **Science**, v. 335, n. 6074, p. 1366–1369, 2012.

NEWMAN, E. B.; LIN, R. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 747–75, 1995.

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

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837–846, jun. 2000.

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

PENG JIANG; JAMES A. PELISKA, AND; 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†. 1998.

PETERSON, C. N.; MANDEL, M. J.; SILHAVY, T. J. *Escherichia coli* Starvation Diets: Essential Nutrients Weigh in Distinctly. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 22, p. 7549–7553, 15 nov. 2005.

PLETNEV, P.; OSTERMAN, I.; SERGIEV, P.; BOGDANOV, A.; DONTSOVA, O. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. **Acta naturae**, v. 7, n. 4, p. 22–33, 2015.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 167–177, 1 jan. 2014.

POPHAM, D. L.; SZETO, D.; KEENER, J.; KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. **Science (New York, N.Y.)**, v. 243, n.

4891, p. 629–35, 3 fev. 1989.

RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 663–670, fev. 2003.

REITZER, L. NITROGEN ASSIMILATION AND GLOBAL REGULATION IN ESCHERICHIA COLI. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155–76, 2003.

REITZER, L.; SCHNEIDER, B. L. Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in Escherichia coli. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 3, p. 422–44, set. 2001.

REZNIKOFF, W. S.; SIEGELE, D. A.; COWING, D. W.; GROSS, C. A. The Regulation of Transcription Initiation in Bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 355–387, 28 dez. 1985.

RILEY, M. *et al.* Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 1, p. 1–9, 2006.

RIPPE, K.; MÜCKE, N.; SCHULZ, A. Association states of the transcription activator protein NtrC from E. coli determined by analytical ultracentrifugation. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 5, p. 915–933, 1998.

RODRIGUES, T. E.; GERHARDT, E. C. M.; OLIVEIRA, M. A.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; SOUZA, G. A.; MÜLLER-SANTOS, M.; HUERGO, L. F. Search for novel targets of the P_{II} signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a P_{II} binding partner. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 751–761, fev. 2014.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, AND T. M. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor, New York., 1989.

SANCHUKI, H. B. S.; GRAVINA, F.; RODRIGUES, T. E.; GERHARDT, E. C. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; RAITTZ, R. T.; VALDAMERI, G.; SOUZA, G. A. DE; HUERGO, L. F. Dynamics of the Escherichia coli proteome in response to nitrogen starvation and entry into the stationary phase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 3, p. 344–352, mar. 2017.

SHAJANI, Z.; SYKES, M. T.; WILLIAMSON, J. R. Assembly of Bacterial Ribosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 501–526, 7 jul. 2011.

SHIMADA, T.; FUJITA, N.; YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A. Novel Roles of cAMP Receptor Protein (CRP) in Regulation of Transport and Metabolism of Carbon Sources. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20081, 1 jun. 2011.

SHIMADA, T.; YOSHIDA, H.; ISHIHAMA, A. Involvement of cyclic AMP receptor protein in regulation of the *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 10, p. 2212–9, maio 2013.

STAROSTA, A. L.; LASSAK, J.; JUNG, K.; WILSON, D. N. The bacterial translation stress response. **FEMS microbiology reviews**, 2014.

SU, W.; PORTER, S.; KUSTU, S.; ECHOLS, H. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5504–8, jul. 1990.

TANI, T. H.; KHODURSKY, A.; BLUMENTHAL, R. M.; BROWN, P. O.; MATTHEWS, R. G. **Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis** PNAS October. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.212510999>. Acesso em: 13 maio. 2019.

TERUI, Y.; TABELI, Y.; AKIYAMA, M.; HIGASHI, K.; TOMITORI, H.; YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A.; IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Ribosome Modulation Factor, an Important Protein for Cell Viability Encoded by the Polyamine Modulon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28698–28707, 10 set. 2010.

UETA, M.; OHNIWA, R. L.; YOSHIDA, H.; MAKI, Y.; WADA, C.; WADA, A. Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemistry**, v. 143, n. 3, p. 425–433, 13 dez. 2008.

UETA, M.; YOSHIDA, H.; WADA, C.; BABA, T.; MORI, H.; WADA, A. Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. **Genes to Cells**, v. 10, n. 12, p. 1103–1112, dez. 2005.

WADA, A.; IGARASHI, K.; YOSHIMURA, S.; AIMOTO, S.; ISHIHAMA, A. Ribosome

Modulation Factor: Stationary Growth Phase-Specific Inhibitor of Ribosome Functions from *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 2, p. 410–417, set. 1995.

WADA, A.; YAMAZAKI, Y.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. **Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells (growth-dependent control/translation regulation/two-dimensional gel electrophoresis)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/pnas/87/7/2657.full.pdf>>. Acesso em: 30 maio. 2019.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V. F.; HENGGE, R. Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity † Downloaded from. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 187, n. 5, p. 1591–1603, 2005.

WOLF, S. G.; FRENKEL, D.; ARAD, T.; FINKEL, S. E.; KOLTER, R.; MINSKY, A. DNA protection by stress-induced biocrystallization. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 83–5, 1 jul. 1999.

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 23, p. 5683–90, 1 dez. 2001.

WRIGHT, P. C.; NOIREL, J.; OW, S.-Y.; FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738–765.e52, 1 mar. 2012.

YAMAGISHI, M.; MATSUSHIMA, H.; WADA, A.; SAKAGAMI, M.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. **The EMBO journal**, v. 12, n. 2, p. 625–30, fev. 1993.

YOSHIDA, H.; MAKI, Y.; FURUIKE, S.; SAKAI, A.; UETA, M.; WADA, A. YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4178–4183, 2012.

YOSHIDA, H.; MAKI, Y.; KATO, H.; FUJISAWA, H.; IZUTSU, K.; WADA, C.; WADA,

A. The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli*. **Journal of biochemistry**, v. 132, n. 6, p. 983–989, 2002.

YOSHIDA, H.; SHIMADA, T.; ISHIHAMA, A. Coordinated Hibernation of Transcriptional and Translational Apparatus during Growth Transition of *Escherichia coli* to Stationary Phase. **mSystems**, v. 3, n. 5, p. e00057-18, 11 set. 2018.

YOSHIDA, H.; WADA, A. The 100S ribosome: Ribosomal hibernation induced by stress. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 2014.

YOSHIDA, H.; YAMAMOTO, H.; UCHIUMI, T.; WADA, A. RMF inactivates ribosomes by covering the peptidyl transferase centre and entrance of peptide exit tunnel. **Genes to Cells**, v. 9, n. 4, p. 271–278, 1 abr. 2004.

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

ZAFAR, M. A.; CARABETTA, V. J.; MANDEL, M. J.; SILHAVY, T. J. Transcriptional occlusion caused by overlapping promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1557–1561, 28 jan. 2014.

ZASLAVER, A.; BREN, A.; RONEN, M.; ITZKOVITZ, S.; KIKOIN, I.; SHAVIT, S.; LIEBERMEISTER, W.; SURETTE, M. G.; ALON, U. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. **Nature methods**, v. 3, n. 8, p. 623–628, 2006.

ZHANG, N.; DARBARI, V. C.; GLYDE, R.; ZHANG, X.; BUCK, M. The bacterial enhancer-dependent RNA polymerase. 2016.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M.-C.; YATES, J. R.; III. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343, 10 abr. 2013.

ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L.; WENDISCH, V. F.; KHODURSKY, A. B.; PETER, B. J.; BENDER, R. A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 97, n. 26, p. 14674–14679, 2000.

Apêndice 1. Proteínas diferencialmente acumuladas após 60 minutos em privação de nitrogênio (-NT2).

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
186.77	P75898	Pyrimidine monooxygenase RutA	<i>rutA</i>	sigma54	NtrC, PhoP, ArcA	RutR	pyrimidine nucleobase catabolic process
48.36	P75897	Peroxyureidoacrylate/lureidoacrylate amidohydrolase RutB	<i>rutB</i>	sigma54	NtrC, PhoP, ArcA	RutR	pyrimidine nucleobase catabolic process
47.35	P76621	Protein CsiD	<i>csiD</i>	sigmaS	CRP, Lrp, H-NS	CsiR	iron binding
32.44	P64463	Putative selenoprotein YdfZ	<i>ydfZ</i>	NI	Fnr	NI	NI
32.08	P14407	Fumarate hydratase class I, anaerobic	<i>fumB</i>	sigma70	ArcA, Crp, DcuR, Fnr, Fur	Fis, NarL	tricarboxylic acid cycle
27.63	P77581	Succinylornithine transaminase	<i>astC</i>	sigmaS, sigma54, sigma70	NtrC, ArgR	NI	arginine metabolic process
23.54	P76217	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	<i>astD</i>	sigmaS, sigma54, sigma70	NtrC, ArgR	NI	arginine metabolic process
23.46	P0AE37	Arginine N-succinyltransferase	<i>astA</i>	sigmaS, sigma54, sigma70	NtrC, ArgR	NI	arginine metabolic process
21.47	P38521	Uncharacterized protein YggL	<i>yggL</i>	NI	NI	NI	NI
20.15	P0AEG4	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	sigma70	CpxR	NI	protein folding, oxidation-reduction process
19.81	P18775	Dimethyl sulfoxide reductase DmsA	<i>dmsA</i>	sigma70	Fnr	Fis, IhfA, IhfB, ModE, NarL	anaerobic respiration, oxidation-reduction process
18.29	P0AFJ1	Protein PhnA	<i>phnA</i>	NI	NI	NI	NI
15.85	P76128	Probable D,D-dipeptide-binding periplasmic protein DdpA	<i>ddpA</i>	sigma54, sigmaS	NtrC	NI	Peptide transport
15.56	P76216	N-succinylarginine dihydrolase	<i>astB</i>	sigmaS, sigma54, sigma70	NtrC, ArgR	NI	arginine metabolic process
15.51	P0A9S5	Glycerol dehydrogenase	<i>gldA</i>	NI	NI	NI	glycerol metabolic process
13.33	P33937	Periplasmic nitrate reductase	<i>napA</i>	sigma70	FilC, FilD, Fnr, ModE, NarP	IscR, NarL, NarP	anaerobic respiration, molybdopterin cofactor biosynthetic process
13.16	P76215	Succinylglutamate desuccinylase	<i>astE</i>	sigmaS, sigma54, sigma70	NtrC, ArgR	NI	arginine metabolic process to glutamate
13.11	P37647	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	<i>kdgK</i>	NI	NI	NI	cellular response to Dna damage stimulus

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
12.89	P0AE91	Protein CreA	<i>creA</i>	sigma32, sigma70	NI	NagC	NI
12.63	P0ABD3	Bacterioferritin	<i>bfr</i>	NI	NI	NI	intracellular sequestering of iron ions, iron ion homeostasis
9.95	P0AEQ6	Glutamine transport system permease protein GlnP	<i>glnP</i>	sigma54	IhfB, IhfA, NtrC	NtrC	transport
9.81	P0AC81	Lactoylglutathione lyase	<i>gloA</i>	sigma70	NI	NemR, RutR	methylglyoxal catabolic process to D-lactate
9.75	P06989	Histidine biosynthesis bifunctional protein HisLE;	<i>hisL</i>	NI	DksA	NI	histidine biosynthetic process
9.38	P0A9X9	Cold shock protein CspA	<i>cspA</i>	sigma70	NI	NI	response to cold, DNA binding
9.34	P32162	UPF0381 protein YjiS	<i>yjiS</i>	sigma24	NI	NI	NI
9.33	P68206	UPF0337 protein YjbJ	<i>yjbJ</i>	NI	NI	FlhZ	NI
9.18	P00805	L-asparaginase 2	<i>ansB</i>	sigma70	Crp, Fnr	Fis	cellular amino acid metabolic process
8.72	P0AC55	Nitrogen regulatory protein P-II 2	<i>glnK</i>	sigmaN	NtrC, GadX, Fnr, Fur	Fnr, Fur	positive regulation of nitrogen utilization
8.53	P0ABK9	Cytochrome c-552	<i>nrfA</i>	sigma70	FliH, FliD, NarL, Fnr, NarP, IhfA, IhfB	Fis, NsrR, NarL, IhfA, IhfB	nitrogen compound metabolic process
8.48	P0AAN3	Hydrogenase isoenzymes nickel incorporation protein HypB	<i>hypB</i>	sigma54	fli, Fnr, IhfB, IhfA	NsrR	cofactor biosynthetic process
8.41	P0ACD8	Hydrogenase-1 large chain	<i>hyaB</i>	sigma70, sigmaS	AppY, ARcA, YdeO	Fis, IscR, NarL, NarP	anaerobic respiration
8.32	Q46851	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	<i>gpr</i>	NI	NI	NI	cellular response to Dna damage stimulus
7.99	P0AAA9	Zinc resistance-associated protein	<i>zraP</i>	sigma54	ZraR	NI	zinc ion binding
7.87	P76170	UPF0482 protein YnfB	<i>ynfB</i>	NI	NI	NI	NI
7.57	P31130	Uncharacterized protein Ydel	<i>ydel</i>	sigma70	RcdA	NI	cellular response to hydrogen peroxide
7.14	P65367	Uncharacterized protein Yqca	<i>yqca</i>	NI	NI	NI	oxidation-reduction process
6.75	P76235	UPF0229 protein Yeah	<i>yeah</i>	sigma54	NtrC	NI	NI

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
6.70	P0C077	mRNA interferase RelE	<i>relE</i>	sigma70	NI	RelB, RelE-RelB	mRNA catabolic process
6.66	P0A6M4	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	<i>dtd</i>	NI	NI	NI	tRNA metabolic process
6.64	P0A998	Ferritin-1	<i>ftnA</i>	sigma70	Fur	H-NS	intracellular sequestering of iron ions
6.27	P77756	7-cyano-7-deazaguanine synthase	<i>queC</i>	NI	NI	NI	queuosine biosynthesis
6.26	P0AFX0	Ribosome hibernation promoting factor	<i>hpf</i>	sigma24, sigma70	NI	NI	negative regulation of translation
6.20	P30748	Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	<i>moaD</i>	NI	Fnr, ModE	CueR	mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process
6.17	P0AF50	Uncharacterized protein YjbR	<i>yjbR</i>	NI	NI	NI	NI
6.03	Q47005	Nitrogen assimilation regulatory protein nac	<i>nac</i>	sigma54	NtrC	Fnr, Fur, Nac	negative regulation of transcription
6.01	P00363	Fumarate reductase flavoprotein subunit	<i>frdA</i>	sigma70, sigmaS	DcuR, Fnr	NarL	anaerobic respiration
5.95	P75893	FMN reductase (NADH) RutF	<i>rutF</i>	sigma54	NtrC, PhoP, ArcA	RutR	pyrimidine nucleobase catabolic process
5.85	P25536	Maf-like protein YhdE	<i>yhdE</i>	NI	NI	NI	metabolic process
5.73	P0ABK2	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 2	<i>cydB</i>	sigma70	ArcA, Cra, HypT, Fnr	Fnr, H-NS	aerobic electron transport chain, oxidative phosphorylation
5.71	P15993	Aromatic amino acid transport protein AroP	<i>aroP</i>	sigma70	Cra	tyrR	aromatic amino acid transmembrane transport
5.59	P12282	Molybdopterin-synthase adenyltransferase	<i>moeB</i>	sigma70	ArcA, NarL	Fnr	mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process
5.54	P55135	23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-methyltransferase RlmD	<i>rlmD</i>	NI	NI	NI	RNA processing
5.47	P0A6A8	Acyl carrier protein	<i>acpP</i>	sigma70	NI	NI	fatty acid biosynthesis
5.39	P77754	Spheroplast protein Y	<i>spy</i>	sigma70	BaeR, CpxR	NI	chaperone-mediated protein folding
5.36	P64479	Uncharacterized protein YdiZ	<i>ydiZ</i>	NI	NI	NI	cellular response to DNA damage stimulus
5.35	P0AEW9	1-phosphofructokinase	<i>fruK</i>	sigma70	NI	Cra	fructose catabolic process
5.29	P25738	Acidic protein MsyB	<i>msyB</i>	sigmaS	NI	NI	NI

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
5.22	P0AAT9	Uncharacterized protein YbeL	<i>ybeL</i>	NI	NI	NI	NI
5.16	P0A9N4	Pyruvate formate-lyase 1-activating enzyme	<i>pflA</i>	sigma70	NI	NI	cellular response to DNA damage stimulus
5.10	P78067	Thiosulfate sulfurtransferase YnjE	<i>ynjE</i>	NI	NI	NI	metabolic process
5.00	P0AGD3	Superoxide dismutase [Fe]	<i>sodB</i>	sigma70	NI	Crp, IhfB, IhfA, NsrR	superoxide metabolic process
4.98	P0AA95	Uncharacterized protein YacC	<i>yacC</i>	sigma70	NI	NI	NI
4.92	P18776	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain B	<i>dmsB</i>	sigma70	Fnr	Fis, IhfA, IhfB, ModE, NarL	anaerobic respiration, oxidation-reduction process
4.90	P27859	Tat-linked quality control protein TatD	<i>tatD</i>	sigma70	NI	NI	misfolded or incompletely synthesized protein catabolic process
4.84	P0AFM4	Phosphate starvation-inducible protein PsjF	<i>psjF</i>	sigma70	PhoB-P	NI	NI
4.75	P23331	Thymidine kinase	<i>tdk</i>	NI	NI	NI	deoxyribonucleoside monophosphate biosynthetic process
4.75	P0ACW6	Uncharacterized protein Ydch	<i>ydch</i>	NI	NI	NI	NI
4.59	P0A6X7	Integration host factor subunit alpha	<i>IHF</i>	sigmaS	NI	DksA, IhfA, IhfB, NsrR	regulation of transcription, regulation of translation
4.58	P39377	Isoaspartyl dipeptidase	<i>iadA</i>	NI	NI	NI	proteolysis
4.58	P0AE63	Cation transport regulator ChaB	<i>chaB</i>	NI	NI	NI	transcription regulation
4.54	P0AD49	Ribosome-associated inhibitor A	<i>raiA</i>	sigma32	Crp	NI	inhibition of translation
4.53	P76104	Uncharacterized protease YdcP	<i>ycdP</i>	NI	NI	NI	proteolysis
4.42	P0ACY3	Uncharacterized protein YeaG	<i>yeaG</i>	sigma54	NtrC	NI	NI
4.39	P76641	Guanine deaminase	<i>guaD</i>	NI	NI	NI	guanine catabolic process
4.34	P31471	Uncharacterized protein YieL	<i>yieL</i>	NI	NI	NI	carbohydrate metabolic process
4.31	P0AB03	Uncharacterized protein YcbJ	<i>ycbJ</i>	NI	NI	NI	metabolic process
4.30	P77395	Uncharacterized protein YbbN	<i>ybbN</i>	sigma32	NI	NI	oxidation-reduction process; chaperone-mediated protein folding

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
4.24	P0ADX5	Uncharacterized protein YhfG	<i>yhfG</i>	NI	NI	NI	NI
4.17	P64451	Uncharacterized lipoprotein YdcL	<i>ydcL</i>	NI	NI	NI	NI
4.14	P0AEQ3	Glutamine-binding periplasmic protein	<i>glnH</i>	sigma54	IhfB, IhfA, NtrC	NtrC	transport
4.09	P09152	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	<i>narG</i>	sigma70	Fnr, IhfB, IhfA, NarL, RstA	Fis	nitrate metabolic process
4.08	P0AAQ2	Uncharacterized protein YajD	<i>yajD</i>	NI	NI	NI	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis
4.07	P64519	Uncharacterized protein YodD	<i>yodD</i>	NI	NI	NI	cellular response to hydrogen peroxide
4.05	P27250	Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein YjgB	<i>yjgB</i>	NI	NI	NI	fatty acid metabolic process
4.02	P0AES9	Acid stress chaperone HdeA	<i>hdeA</i>	sigma70, sigmaS	GadE, PhoP, RcsB, TorR, GadW, GadX	Flz, H-NS, Lrp, MarA, GadW, GadX	cellular response to acidic pH
4.00	P42616	Protein YqjC	<i>yqjC</i>	NI	NI	NI	NI
3.97	P0AFD6	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	<i>nuoI</i>	sigma70	Fis, NarL	ArcA, Fnr, IhfB, IhfA	NADH:ubiquinone oxidoreductase aerobic respiration
3.97	P0AFC3	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	<i>nuoA</i>	sigma70	Fis, NarL	ArcA, Fnr, IhfA, IhfB	oxidation-reduction process
3.90	P39835	High-affinity gluconate transporter	<i>gntT</i>	sigma70	Crp	GntR	carbohydrate transport
3.87	P0A9Y6	Cold shock-like protein CspC	<i>cspC</i>	sigma70	NI	NI	negative regulation of transcription
3.84	P0A9C5	Glutamine synthetase	<i>glnA</i>	sigma54, sigma70	NtrC, CRP, Fis	NtrC, CRP	glutamine biosynthetic process
3.76	P0A729	Maf-like protein YceF	<i>yceF</i>	NI	NI	NI	metabolic process
3.72	P69805	Mannose permease IID component	<i>manZ</i>	sigma70	Crp	Cra, Mlc, NagC	mannose transport
3.69	P0A6E9	ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD 2	<i>ynfK</i>	sigma70, sigma32	Crp	Mlc	biotin biosynthetic process
3.67	P0AA25	Thioredoxin-1	<i>trxA</i>	sigma70	ppGpp	cyclicAMP-Crp	cell redox homeostasis, glycerol ether metabolic process
3.63	P0AEU7	Chaperone protein skp	<i>skp</i>	sigma24	CpxR, GadE	NI	chaperone mediated protein folding requiring cofactor

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
3.62	P07913	L-threonine 3-dehydrogenase	<i>tdh</i>	sigma70	Lrp	NI	L-serine biosynthetic process
3.60	P42599	Uncharacterized oxidoreductase YgjR	<i>ygjR</i>	NI	NI	NI	oxidoreductase activity
3.56	P69811	Multiphosphoryl transfer protein	<i>fruB</i>	sigma70	NI	Cra	fructose import
3.54	P32685	Uncharacterized protein Yjbd	<i>yjbd</i>	NI	NI	NI	NI
3.51	P32176	Formate dehydrogenase-O major subunit	<i>fdoG</i>	NI	NI	NI	anaerobic respiration, cellular respiration
3.47	P64534	Nickel/cobalt homeostasis protein RcnB	<i>rcnB</i>	sigma70	NI	Fur, RcnR	cellular response to DNA damage stimulus
3.44	P0ADV1	Lipopolysaccharide export system protein LptA	<i>lptA</i>	sigma70, sigma24	NI	NI	lipopolysaccharide transport
3.43	P39353	Uncharacterized oxidoreductase Yjhc	<i>yjhc</i>	sigma32	NI	NanR	cellular response to DNA damage stimulus
3.41	P0AFB8	Nitrogen regulation protein NR(I)	<i>glnG</i>	sigma54, 70	NtrC, CRP, Fis	NtrC, CRP	Two-component regulatory system, nitrogen fixation
3.32	P37095	Peptidase B	<i>pepB</i>	NI	NI	NI	proteolysis
3.29	P0ADP2	Uncharacterized protein Yigl	<i>yigl</i>	NI	NI	NI	NI
3.26	P0A7L3	50S ribosomal protein L20	<i>rpL7</i>	sigma70	NI	DskA, Fnr, NsrR	ribosomal large subunit assembly, translation
3.26	P25552	Guanosine-5-triphosphate,3-diphosphate pyrophosphatase	<i>gppA</i>	NI	NI	NI	response to starvation
3.25	P23894	Protease HtpX	<i>htpX</i>	sigma32	NI	NI	proteolysis
3.23	P0A7A9	Inorganic pyrophosphatase	<i>ppa</i>	NI	NI	NI	phosphate-containing compound metabolic process
3.18	P04036	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	<i>dapB</i>	sigma70	ArgP	NI	lysine biosynthetic process
3.16	P13029	Catalase-peroxidase	<i>katG</i>	sigma70	Fnr, Fur, OxyR	NI	response to oxidative stress
3.15	P76402	UPF0339 protein YegP	<i>yegP</i>	NI	NI	NI	NI
3.14	P33219	Protein YebF	<i>yebF</i>	NI	NI	NI	NI
3.13	P0AAZ7	UPF0434 protein YcaR	<i>ycaR</i>	sigma70	NI	NI	NI

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
3.12	P77737	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	<i>oppF</i>	sigma28	NI	ArcA, Fur, Lpr, ModE	oligopeptide transporter, murein turnover
3.10	P21338	Ribonuclease I	<i>rna</i>	NI	NI	NI	RNA catabolic process
3.09	P0A9L8	Proline-5-carboxylate reductase	<i>proC</i>	NI	NI	NI	L-proline biosynthetic process
3.07	P0A9L5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	<i>ppiC</i>	NI	NI	NI	protein peptidyl-prolyl isomerization
2.99	P31808	Uncharacterized oxidoreductase YciK	<i>yciK</i>	NI	NI	NI	oxidation-reduction process
2.94	P0ABT2	DNA protection during starvation protein	<i>dps</i>	sigma70, sigmaS	lhfB, lhfA, OxyR	Fis, H-NS, MntR	response to starvation, response to stress
2.93	P12295	Uracyl-DNA glycosylase	<i>ung</i>	NI	NI	P-CpxR	base-excision repair
2.90	P0ACF4	DNA-binding protein HU-beta	<i>hupB</i>	sigma70	Crp	Fis	transcription
2.89	P0C037	UPF0345 protein YaiE	<i>yaiE</i>	NI	NI	NI	NI
2.89	P31057	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>panB</i>	sigma70	NI	NI	pantothenate biosynthetic process from valine
2.87	P62672	Protein ApaG	<i>apaG</i>	sigma24	Fis	NI	NI
2.83	P52106	CsgBAC operon transcriptional regulatory protein	<i>csgD</i>	sigmaS, sigma70	BasR, Cra, Crp, CsgD, lhfA, lhfB, MlrA, OmpR, RcdA	CpxR, Flz, RcsA, RcsB, RstA	regulation of biofilm formation
2.82	P75949	Beta-hexosaminidase	<i>nagZ</i>	NI	NI	NI	peptidoglycan turnover
2.82	P0ABJ9	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 1	<i>cydA</i>	sigma70	ArcA, Cra, HypT, Fnr	Fnr, H-NS	aerobic electron transport chain, oxidative phosphorylation
2.81	P0A7X3	30S ribosomal protein S9	<i>rpsI</i>	sigma70	NI	Fnr, Fis, Crp	translation
2.78	P0A8A0	Probable transcriptional regulatory protein YebC	<i>yebC</i>	sigma70	NI	NI	regulation of transcription, DNA-templated
2.76	P64429	Uncharacterized protein YpfJ	<i>ypfJ</i>	NI	NI	NI	NI
2.75	P0ADA3	Murein hydrolase activator NlpD	<i>nlpD</i>	sigma70	NI	NI	autolysis, cell separation
2.75	P51025	S-formylglutathione hydrolase FrmB	<i>frmB</i>	NI	NI	NI	formaldehyde catabolic process

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
2.74	P62768	UPF0325 protein YaeH	<i>yaeH</i>	NI	NI	NI	NI
2.69	P24178	Protein YffB	<i>yffB</i>	sigma70	NI	NI	NI
2.68	P63204	Transcriptional regulator GadE	<i>gadE</i>	sigma70, sigmaS	ArcA, EvgA, GadE, GadW, GadX, PhoP, YdeO	Crp, Flz, H-NS	regulation of transcription
2.67	Q46927	Uncharacterized protein YgdL	<i>ygdL</i>	NI	NI	NI	cyclic threonylcarbamoyladenosine biosynthetic process
2.64	P0ACU0	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YbiH	<i>ybiH</i>	NI	NI	NI	regulation of transcription, DNA-templated
2.63	P36771	Probable HTH-type transcriptional regulator LrhA	<i>lrhA</i>	NI	LrhA	NI	regulation of transcription
2.63	P0A7W7	30S ribosomal protein S8	<i>rpsH</i>	NI	NI	DskA	regulation of mRNA stability, translation
2.62	P76176	Uncharacterized serine protease YdgD	<i>ydgD</i>	NI	NI	NI	proteolysis
2.58	P0C8J6	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY	<i>gatY</i>	sigma70	Crp	ArcA, GatR_1, GatR_2	carbohydrate metabolic process
2.57	P60438	50S ribosomal protein L3	<i>rpL3</i>	sigma70	Fnr	ArcA, DskA	translation
2.56	P0A7K2	50S ribosomal protein L7/L12	<i>rpL7</i>	NI	NI	DskA	translation
2.53	P0AEM9	Cystine-binding periplasmic protein	<i>fliY</i>	sigmaS, sigma28, sigma70	FliH, FliD, H-NS	CsgD, MatA, NsrR, SutrR	L-cystine transport
2.52	P0ADV7	Probable phospholipid-binding protein MlaC	<i>mlaC</i>	NI	NI	NI	phospholipid transport
2.51	P29745	Peptidase T	<i>pepT</i>	NI	Fnr	NI	Peptidase, protein turnover, degradation
2.49	P0AEF8	Dipeptide transport system permease protein DppB	<i>dppB</i>	sigma70	IhfB, IhfA	Fnr	protein transport
2.48	P21599	Pyruvate kinase II	<i>pykA</i>	sigma70, sigmaS	NI	NI	glycolytic process
2.45	P38506	Protein Xni	<i>ygdG</i>	NI	NI	NI	DNA replication, Okazaki fragment processing
2.43	P0C018	50S ribosomal protein L18	<i>rpL18</i>	NI	NI	DskA	translation
2.39	P0C0R7	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	<i>rImE</i>	sigma32, sigma70	NI	NI	enzyme-directed rRNA 2'-O-methylation

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
2.37	P0A756	Glutathione-regulated potassium-efflux system ancillary protein KefG	<i>kefG</i>	NI	NI	NI	potassium ion transport
2.34	P76114	HTH-type transcriptional regulator McbR	<i>mcbR</i>	NI	NI	NI	negative regulation of transcription
2.34	P38051	Menaquinone-specific isochorismate synthase	<i>menF</i>	NI	NI	NI	menaquinone biosynthetic process
2.33	P09372	Protein GrpE	<i>grpE</i>	sigma32	Crp	NI	response to heat
2.32	Q2M7R5	Uncharacterized protein YibT	<i>yibT</i>	NI	NI	NI	NI
2.31	P29217	UPF0502 protein YceH	<i>yceH</i>	NI	NI	NI	NI
2.30	P0A959	Glutamate-pyruvate aminotransferase AlaA	<i>alaA</i>	sigma32	NI	Lrp	alanine biosynthetic process
2.30	P22106	Asparagine synthetase B [glutamine-hydrolyzing]	<i>asnB</i>	NI	GadX	NI	asparagine biosynthetic process
2.28	P64585	Inner membrane protein YqjE	<i>yqjE</i>	NI	NI	NI	NI
2.28	P0A9K1	Protein PhoH	<i>phoH</i>	sigma70	PhoB	NI	Stress response
2.24	P0ADT5	Uncharacterized protein YgiC	<i>ygiC</i>	sigmaS	MarA, PhoP, Rob, SoxS	NI	metabolic process
2.24	P0AG07	Ribulose-phosphate 3-epimerase	<i>rpe</i>	sigma70	NI	NI	pentose-phosphate shunt, non oxidative branch
2.23	P68767	Cytosol aminopeptidase	<i>pepA</i>	sigma70	NI	PepA	peptide catabolic process
2.22	P0AET8	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	<i>hdhA</i>	NI	NI	NI	metabolic process
2.22	P0A9H1	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	<i>mug</i>	NI	NI	NI	DNA-repair
2.20	P76193	Probable L,D-transpeptidase YnhG	<i>ynhG</i>	NI	NI	NI	Cell shape, Cell wall biogenesis/degradation, Peptidoglycan synthesis
2.18	P27829	UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase	<i>wecC</i>	sigma70	NI	nitric oxide-NsrR	enterobacterial common antigen biosynthetic process
2.18	P37767	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YfhH	<i>yfhH</i>	NI	NI	NI	Transcription regulation
2.17	P37902	Glutamate/aspartate periplasmic-binding protein	<i>gltI</i>	sigma54, sigma70	FlhC, FlhD	NI	amino acid transport

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
2.16	Q46948	Chaperone protein YajL	<i>yajL</i>	NI	NI	NI	cellular response to oxidative stress
2.15	P67603	UPF0267 protein YqfB	<i>yqfB</i>	NI	NI	NI	NI
2.13	P0ACF0	DNA-binding protein HU-alpha	<i>hupA</i>	NI	Crp, Fis	NI	transcription
2.13	P33224	Putative acyl-CoA dehydrogenase AidB	<i>aidB</i>	sigma70, sigmaS	Ada	AidB, Lrp	cellular response to DNA damage stimulus
2.11	P0AAN9	Anti-adaptor protein IraP	<i>iraP</i>	sigma70	CsgD, ppGpp	NI	negative regulation of protein catabolic process
2.10	P0A832	SsrA-binding protein	<i>smpB</i>	NI	NI	NI	trans-translation-dependent protein tagging
2.09	A5A621	Uncharacterized protein YpfM	<i>ypfM</i>	NI	NI	NI	Stress response
2.09	P27303	Multidrug resistance protein A	<i>emrA</i>	sigma70	NI	mprA	drug transmembrane transport, response to antibiotic
2.08	P52095	Lysine decarboxylase, constitutive	<i>ldcC</i>	sigmaS	NI	NI	lysine catabolic process
2.06	P37747	UDP-galactopyranose mutase	<i>glf</i>	NI	NI	NI	lipopolysaccharide metabolic process
2.05	P09831	Glutamate synthase [NADPH] large chain	<i>glfB</i>	sigma70	AdiY, GadE, HdfR, IhfB, IhfA, Lrp, Lrp-leu	ArgR, Crp, Fnr, Fur, Nac	ammonia assimilation cycle
2.04	P0ADX7	Uncharacterized protein YhhA	<i>yhhA</i>	NI	NI	NI	NI
2.04	P0A8W5	UPF0301 protein YqgE	<i>yqgE</i>	NI	NI	NI	NI
2.03	P0A7A2	Probable phosphoglycerate mutase GpmB	<i>gpmB</i>	NI	NI	NI	glycolytic process
2.03	P0AC23	Probable formate transporter 1	<i>focA</i>	sigma70	ArcA, Crp, Fnr, IhfB, IhfA	NarL	formate transport
2.03	Q46822	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	<i>idi</i>	NI	NI	NI	isoprenoide biosynthetic process
2.03	P31697	Chaperone protein FimC	<i>fimC</i>	sigma70	H-NS, IhfB, IhfA, Lrp	NI	pilus organization
2.02	P0AFL3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>ppiA</i>	sigma70	CpxR, Crp	Crp, CytR	protein peptidyl-prolyl isomerization
2.01	P29131	Cell division protein FtsN	<i>ftsN</i>	NI	NI	NI	cell division

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotr	Ativador	Inibidor	Função Biológica
2.01	P23882	Methionyl-tRNA formyltransferase	<i>fmt</i>	sigma70	NI	NI	charged-tRNA amino acid modification

**Fold change* representa o acúmulo relativo de proteínas sob privação de nitrogênio em -NT2 em comparação com a condição +N. Função biológica, tipo de promotor, ativadores e repressores foram manualmente retirado do banco de dados Ecocyc.

Apêndice 2. Proteínas com menor acúmulo após 60 minutos de privação de nitrogênio (-NT2).

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-582.53	P0AEJ2	Isochorismate synthase EntC	<i>entC</i>	sigma70	Crp	Fur	enterobactin biosynthetic process
-240.31	P37329	Molybdate-binding periplasmic protein	<i>modA</i>	sigma28, sigma70	Crp	ModE	molybdate ion transport
-93.86	P39452	Ribonucleoside-diphosphate reductase 2 subunit alpha	<i>nrdE</i>	sigma70	IscR	Fur, NrdR	Dna replication
-71.76	P0A7N4	50S ribosomal protein L32	<i>rpmF</i>	NI	NI	NI	Translation
-63.90	P13039	Enterochelin esterase	<i>fes</i>	sigma70	Fnr, H-NS	Fur	iron ion transport
-56.63	P37128	GDP-mannose pyrophosphatase NudK	<i>nudK</i>	NI	NI	NI	metabolic process
-55.22	P69910	Glutamate decarboxylase beta	<i>gadB</i>	sigmaS, sigma70	AdiY, GadE, GadX, RcsB, GadW	Crp, Fis, FliZ, GadW	glutamate metabolic process
-51.42	P76344	Metal-binding protein ZinT	<i>zinT</i>	sigma70	Fur, SoxS	Zur	cellular response to zinc ion starvation, response to cadmium ion
-33.95	P10378	Enterobactin synthase component E;2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase;S-dihydroxybenzoyltransferase	<i>entE</i>	sigma70	Crp	Fur	enterobactin biosynthetic process
-33.76	P11454	Enterobactin synthase component F	<i>entF</i>	sigma70	Fnr, H-NS	Fur	enterobactin biosynthetic process
-31.31	P0A6J1	Adenylyl-sulfate kinase	<i>cysC</i>	sigma70	CysB	NI	sulfate assimilation, phosphorylation
-30.58	P17315	Colicin I receptor	<i>cirA</i>	sigma70	Crp	Fur	iron assimilation
-30.49	P0A8Y8	Proofreading thioesterase EntH	<i>entH</i>	sigma70	Crp	Fur	enterobactin biosynthetic process
-29.58	P75779	PKHD-type hydroxylase YbiX	<i>ybiX</i>	NI	NI	NI	cellular iron ion homeostasis
-29.05	P0ADI4	Isochorismatase	<i>entB</i>	sigma70	Crp	Fur	enterobactin biosynthetic process
-26.40	P18393	Uncharacterized protein YbdZ	<i>ybdZ</i>	sigma70	Fnr, H-NS	Fur	enterobactin biosynthetic process
-18.31	P15047	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	<i>entA</i>	sigma70	Crp	Fur	enterobactin biosynthetic process
-18.30	P0ABP8	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type	<i>deoD</i>	sigma70	Fis, Crp	CytR, DeoR, ModE, Crp	purine nucleoside catabolic process
-17.13	P39172	High-affinity zinc uptake system protein ZnuA	<i>znuA</i>	sigmaS	NI	Zur	Maximally induced 30 minutes under zinc-limiting conditions, still induced in stationary phase.

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-14.11	P0AC65	Glutaredoxin-like protein NrdH	<i>nrdH</i>	sigma70	IscR	Fur, NrdR	Dna replication
-13.79	P05825	Ferrienterobactin receptor	<i>fepA</i>	sigma70	Crp	Fur	ferric-enterobactin transport
-13.35	P0AFX4	Regulator of sigma D	<i>rsd</i>	sigma70, sigmaS	NI	NI	transcription, DNA-templated
-12.59	P77171	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YdcI	<i>ydcI</i>	NI	NI	NI	transcription, DNA-templated
-11.92	P64476	Uncharacterized protein YdiH	<i>ydiH</i>	NI	NI	NI	NI
-11.34	P0AG18	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	<i>purE</i>	sigma70	NI	PurR	de novo IMP biosynthetic process, purine nucleotide biosynthetic process
-11.01	P37613	Uncharacterized protein YhhK	<i>yhhK</i>	NI	NI	NI	pantothenate biosynthetic process, zymogen activation
-10.99	P0A9P6	Cold-shock DEAD box protein A	<i>deaD</i>	sigma70	NI	NI	ribosomal large subunit assembly
-10.59	P0AAT6	Ribosomal silencing factor RsfS	<i>rsfS</i>	NI	NI	NI	negative regulation of ribosome biogenesis
-10.36	P23878	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC	<i>fepC</i>	sigma70	NI	Fur	Transport
-9.89	P0ABU7	Biopolymer transport protein ExbB	<i>exbB</i>	sigma70	NI	Fur	protein stabilization
-9.74	P37774	Uncharacterized amino-acid ABC transporter ATP-binding protein YecC	<i>yecC</i>	NI	NI	NI	amino acid transport
-9.73	P0AEW4	3,5-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA	<i>cpdA</i>	NI	CreB	NI	metabolic process
-9.61	P65556	Uncharacterized Nudix hydrolase YfcD	<i>yfcD</i>	NI	NI	NI	metabolic process
-9.34	P12996	Biotin synthase	<i>bioB</i>	sigma70	NI	BirA	biotin biosynthetic process
-9.03	P0ADQ7	Uncharacterized protein YgaM	<i>ygaM</i>	NI	NI	NI	NI
-9.02	P76507	Uncharacterized protein YfdI	<i>yfdI</i>	NI	NI	NI	NI
-8.71	P39405	Ferric iron reductase protein FhuF	<i>fhuF</i>	sigma70	NI	Fur, OxyR	iron assimilation
-8.31	P77689	FeS cluster assembly protein SufD	<i>sufD</i>	sigma70	IhfA-IhfB, IscR, OxyR	NsrR, Fur	iron-sulfur cluster assembly, response to oxidative stress
-8.06	P33650	Ferrous iron transport protein B	<i>feoB</i>	sigma70	Fnr, NagC	Fur, NagC	cellular response to DNA damage stimulus
-8.02	P0ADX1	Protein YhfA	<i>yhfA</i>	sigma70	Crp	Crp	response to oxidative stress

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-7.98	P0ADS6	Uncharacterized protein YggE	<i>yggE</i>	sigmaS	NI	NI	cellular response to DNA damage stimulus
-7.93	P0A9F9	HTH-type transcriptional regulator MetR	<i>metR</i>	NI	MetJ, MetR		regulation of transcription
-7.88	P12995	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxonanoate aminotransferase	<i>bioA</i>	sigma70	NI	BirA	biotin biosynthetic process
-7.70	P17854	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	<i>cysH</i>	sigma70	CysB, HypT, IhfB, IhfA	NI	sulfur compound metabolic process, sulfate assimilation
-7.69	P16676	Sulfate/triosulfate import ATP-binding protein CysA	<i>cysA</i>	sigma70	CysB	H-NS	sulfate transport
-7.62	P0ADG1	Acetolactate synthase isozyme 2 small subunit	<i>ilvM</i>	sigma70	IhfB, IhfA	IhfB, IhfA, Lrp	isoleucine biosynthetic process
-7.48	P63264	Chaperone modulatory protein CbpM	<i>cbpM</i>	sigmaS, sigma70	NI	Fis	negative regulation of catalytic activity
-7.36	P0A731	Methylglyoxal synthase	<i>mgsA</i>	NI	NI	NI	methylglyoxal biosynthetic process
-7.27	P06993	HTH-type transcriptional regulator MalT	<i>malT</i>	sigma70	Crp, Lrp	Mic	carbohydrate metabolic process
-7.23	P77806	Methionine aminotransferase	<i>ybdL</i>	NI	NI	NI	biosynthetic process
-7.11	P30136	Phosphomethylpyrimidine synthase	<i>thiC</i>	NI	NI	NI	thiamine diphosphate biosynthetic process
-7.10	P0CB39	Phosphoethanolamine transferase EptC	<i>eptC</i>	NI	NI	NI	lipid metabolic process
-6.44	P0A968	Cold shock-like protein CspD	<i>cspD</i>	sigma70	Crp, H-NS	MqsA	negative regulation of DNA replication
-6.36	P0A7H6	Recombination protein RecR	<i>recR</i>	sigma24	NI	NI	DNA synthesis involved in DNA repair
-6.26	P31992	Tautomerase PptA	<i>pptA</i>	NI	NI	NI	cellular aromatic compound metabolic process
-6.17	P08142	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit	<i>ilvB</i>	sigma70	Crp	NI	isoleucine biosynthetic process
-5.94	P0AFZ1	Protein SseB	<i>sseB</i>	NI	NI	NI	NI
-5.69	P00892	Acetolactate synthase isozyme 2 large subunit	<i>ilvG</i>	sigma70	IhfB, IhfA	IhfB, IhfA, Lrp	isoleucine biosynthetic process
-5.69	P30140	2-iminoacetate synthase	<i>thiH</i>	NI	NI	NI	cellular response to DNA damage stimulus, cellular response to DNA damage stimulus
-5.66	P76116	Uncharacterized protein YncE	<i>yncE</i>	NI	MarA	NI	DNA binding

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-5.49	P30139	Thiazole synthase	<i>thiG</i>	NI	NI	NI	thiamine diphosphate biosynthetic process
-5.46	P0A6C5	Amino-acid acetyltransferase	<i>argA</i>	<i>sigma70</i>	NI	ArgG	arginine biosynthetic process
-5.44	Q46893	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	<i>ispD</i>	NI	NI	NI	isoprenoide biosynthetic process
-5.39	P64540	Uncharacterized protein YfcL	<i>yfcL</i>	NI	NI	NI	NI
-5.38	Q46871	NADPH-dependent ferric-chelate reductase	<i>yqjH</i>	<i>sigma70</i>	NI	Fur, YqjI	cellular response to nickel ion, iron assimilation
-5.35	P23883	Aldehyde dehydrogenase PuuC	<i>puuC</i>	<i>sigmaS</i>	NI	ArcA-P, Crp, PuuR	putrescine catabolic process
-5.31	P0A9X1	Zinc import ATP-binding protein ZnuC	<i>znuC</i>	<i>sigma70</i>	NI	Zur	Ion transport, Transport, Zinc transport
-5.09	P0AGK8	HTH-type transcriptional regulator IscR	<i>iscR</i>	<i>sigma70</i>	NI	IscR	regulatio of transcription
-5.05	P09151	2-isopropylmalate synthase	<i>leuA</i>	<i>sigma70</i>	LeuO	NI	leucine biosynthetic process
-4.93	P09833	Molybdenum import ATP-binding protein ModC	<i>modC</i>	<i>sigma28, sigma70</i>	Crp	ModE	molybdate ion transport
-4.93	P23845	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	<i>cysN</i>	<i>sigma70</i>	CysB	NI	sulfate assimilation
-4.79	P0ABA4	ATP synthase subunit delta	<i>atpH</i>	<i>sigma70</i>	NI	NI	ATP synthesis coupled proton transport
-4.73	P21156	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	<i>cysD</i>	<i>sigma70</i>	CysB	NI	sulfate assimilation
-4.65	P0AD68	Peptidoglycan synthase FtsI	<i>ftsI</i>	<i>sigma70</i>	NI	LexA, MraZ, PdhR	cell Division
-4.58	P68191	Stationary-phase-induced ribosome-associated protein	<i>sra</i>	<i>sigmaS</i>	Fis, IhfB-IhfA, RcsB	OmpR	Translation
-4.54	P30138	Sulfur carrier protein ThiS adenylyltransferase	<i>thiF</i>	NI	NI	NI	cellular protein modification process, thiamine diphosphate biosynthetic process
-4.43	P0AG82	Phosphate-binding protein PstS	<i>pstS</i>	<i>sigma70, sigmaS</i>	Fnr, IhfA, IhfB, PhoB	NI	cellular response to DNA damage stimulus, phosphate transport
-4.38	P0AEE5	D-galactose-binding periplasmic protein	<i>mgIB</i>	<i>sigma70, sigmaS</i>	Crp	Fis, FliC, FliH, GalR, GalS	carbohydrate transport
-4.35	P77499	Probable ATP-dependent transporter SufC	<i>sufC</i>	<i>sigma70</i>	IhfA-IhfB, IscR, OxyR	NsrR, Fur	iron-sulfur cluster assembly, transport
-4.32	P09126	Uroporphyrinogen-III synthase	<i>hemD</i>	NI	NI	NI	protoporphyrinogen IX biosynthetic process

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-4.31	P0A6E6	ATP synthase epsilon chain	<i>atpC</i>	sigma70	NI	NI	ATP synthesis coupled proton transport
-4.30	P21829	Pyridoxal phosphate phosphatase YbhA	<i>ybhA</i>	NI	NI	NI	Dephosphorylation
-4.24	P0C079	recombination protein RecR	<i>relB</i>	sigma70	NI	RelB, RelE-RelB	regulation of transcription, DNA-templated
-4.20	P0A8J4	UPF0250 protein YbeD	<i>ybeD</i>	sigma32, sigma70	NI	NI	NI
-4.18	P19636	Ethanolamine ammonia-lyase light chain	<i>eutC</i>	NI	NI	NI	cellular amino acid metabolic process
-3.96	P0A7U3	30S ribosomal protein S19	<i>rpsS</i>	sigma70	Fnr	ArcA, DskA	ribosomal small subunit assembly, translation
-3.90	P33360	Putative osmoprotectant uptake system ATP-binding protein YehX	<i>yehX</i>	sigma32, sigmaS	NI	NI	Transport
-3.86	P31828	Probable zinc protease PqqL	<i>pqqL</i>	NI	NI	NI	Proteolysis
-3.86	P0AEM4	Negative regulator of flagellin synthesis	<i>pqqL</i>	sigma28, sigma70	FliC, FliD	CsgD	negative regulation of proteolysis
-3.82	P61517	Carbonic anhydrase 2	<i>can</i>	sigma32, sigma70	NI	NI	metabolic process, carbon utilization
-3.77	P0AFM2	Glycine betaine-binding periplasmic protein	<i>proX</i>	sigma70, sigmaS	NI	H-NS	cellular response to osmotic stress, amino acid transport
-3.77	P0A6K3	Peptide deformylase	<i>def</i>	sigma70	NI	NI	N-terminal protein amino acid modification
-3.74	P0AG16	Amidophosphoribosyltransferase	<i>purF</i>	sigma70	NI	PurR	de novo IMP biosynthetic process, purine nucleotide biosynthetic process
-3.72	P0AFM6	Phage shock protein A	<i>pspA</i>	sigmaN	PspF, IhfA, IhfB	NI	phage shock, response to heat
-3.67	P46889	DNA translocase FtsK	<i>ftsK</i>	sigma70	NI	LexA	cell Division
-3.67	P75829	Uncharacterized protein YbjX	<i>ybjX</i>	NI	NI	NI	cellular response to DNA damage stimulus
-3.65	P0AAG8	Galactose/methyl galactoside import ATP-binding protein MglA	<i>mglA</i>	sigma70, sigmaS	Crp	Fis, FliC, FliD, GalR, GalS	galactose transport
-3.60	P0C960	Endo-type membrane-bound lytic murein transglycosylase A	<i>emtA</i>	NI	NI	NI	peptidoglycan metabolic process, peptidoglycan turnover
-3.59	P64581	Uncharacterized protein YqjD	<i>yqjD</i>	NI	NI	NI	protein binding, ribosomal small subunit binding
-3.49	P0AG27	Uncharacterized protein YibN	<i>yibN</i>	NI	NI	NI	NI

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-3.46	P31069	Voltage-gated potassium channel Kch	<i>kch</i>	NI	NI	NI	potassium ion transport
-3.41	P45578	S-ribosylhomocysteine lyase	<i>luxS</i>	sigmaS	NI	NI	quorum sensing
-3.39	P75818	Uncharacterized lipoprotein YbjP	<i>ybjP</i>	sigmaS	NI	NI	NI
-3.38	P0A9Q9	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	<i>asd</i>	NI	ArgP	NI	homoserine biosynthetic process, amino acid biosynthesis
-3.37	P06960	Ornithine carbamoyltransferase chain F	<i>argF</i>	sigma70	NI	ArgR	arginine biosynthetic process
-3.37	Q47146	Acyl-coenzyme A dehydrogenase	<i>fadE</i>	NI	NI	ArcA, FadR	fatty acid beta-oxidation using Acyl-Coa dehydrogenase
-3.37	P77522	FeS cluster assembly protein SufB	<i>sufB</i>	sigma70	IhfA-IhfB, IscR, OxyR	NsrR, Fur	iron-sulfur cluster assembly
-3.32	P76243	Uncharacterized protein YeaO	<i>yeaO</i>	NI	NI	NI	NI
-3.31	P00861	Diaminopimelate decarboxylase	<i>lysA</i>	sigma70	ArgP, LysR	NI	lysine biosynthetic process
-3.28	P17993	3-demethylubiquinone-9-3-methyltransferase	<i>ubiG</i>	sigma70	cyclicAMP-Crp	NI	ubiquinone biosynthetic process
-3.28	P0AAV6	Uncharacterized protein YbgS	<i>ybgS</i>	NI	NI	NI	NI
-3.27	P30137	Thiamine-phosphate synthase	<i>thiE</i>	NI	NI	NI	thiamine diphosphate biosynthetic process
-3.26	P0A7M6	50S ribosomal protein L29	<i>rpmC</i>	sigma70	Fnr	ArcA, DskA	Translation
-3.24	P18390	Uncharacterized protein YjJA	<i>yjJA</i>	NI	NI	NI	NI
-3.21	P0ADK8	Uncharacterized protein YibL	<i>yibL</i>	NI	NI	NI	NI
-3.19	P52007	Protein YecM	<i>yecM</i>	NI	NI	NI	NI
-3.18	P39407	Uncharacterized protein YjJU	<i>yjJU</i>	NI	NI	NI	cellular response to DNA damage stimulus
-3.18	P05041	Para-aminobenzoate synthase component 1	<i>pabB</i>	NI	NI	NI	folic acid biosynthetic process, tetrahydrofolate biosynthetic process
-3.17	P0A8C4	UPF0149 protein YgfB	<i>ygfB</i>	sigma70	NI	NI	NI
-3.13	P0A955	KHG/KDPG aldolase;4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase;2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase	<i>eda</i>	sigma70	NI	Cra, GntR, KdgR, PhoB	metabolic process

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-3.11	P26365	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiB	<i>amiB</i>	sigma70	NI	NI	peptidoglycan catabolic process, cell wall organization
-3.10	P77718	tRNA sulfurtransferase	<i>thil</i>	NI	NI	SAM	thiazole biosynthetic process, thiamine diphosphate biosynthetic process
-3.10	P0A8Z7	Esterase YqiA	<i>yqiA</i>	NI	CreB	NI	metabolic process
-3.09	P77444	Cysteine desulfurase	<i>sufS</i>	sigma70	IhfA-IhfB, Iscr, OxyR	NsrR, Fur	cysteine metabolic process
-3.02	P0AGA6	Transcriptional regulatory protein UhpA	<i>uhpA</i>	NI	NI	NI	regulation of transcription, DNA-templated
-3.02	P76008	Murein tetrapeptide carboxypeptidase	<i>ldcA</i>	NI	NI	NI	glycopeptide catabolic process
-3.02	P0A6T5	GTP cyclohydrolase 1	<i>folE</i>	sigma70	NI	MetJ	queuosine biosynthetic process
-3.01	P0A6V1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	<i>glgC</i>	sigmaS, sigma70	Crp, PhoP, ppGpp	NI	glycogen biosynthetic process
-3.00	P0AEL6	Ferrienterobactin-binding periplasmic protein	<i>fepB</i>	sigma70	NI	Fur, RutR	cellular response to Dna damage stimulus
-2.97	P77302	Probable diguanylate cyclase YdaM	<i>ydaM</i>	NI	NI	NI	positive regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity
-2.95	P0AD57	Octaprenyl-diphosphate synthase	<i>ispB</i>	NI	NI	NI	ubiquinone biosynthetic process
-2.86	P76535	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	<i>murQ</i>	sigma70, sigmaS	Crp	MurR	peptidoglycan turnover
-2.84	P0A7R9	30S ribosomal protein S11	<i>rpsK</i>	sigma70	NI	DskA	Translation
-2.81	P0A8B5	Nucleoid-associated protein YbaB	<i>ybaB</i>	sigma24	NI	NI	response to stress
-2.80	P23003	tRNA (uracil(54)-C(5))-methyltransferase	<i>trmA</i>	sigma32	Fis	NI	tRNA methylation
-2.78	P33371	tRNA-dihydrouridine synthase C	<i>dusC</i>	NI	NI	NI	tRNA processing
-2.76	P68688	Glutaredoxin-1	<i>grxA</i>	NI	OxyR	NI	oxidation-reduction process
-2.76	P37595	Isoaspartyl peptidase; Isoaspartyl peptidase subunit alpha; Isoaspartyl peptidase subunit beta	<i>iaaA</i>	NI	NI	NI	protein autoprocessing
-2.70	Q47150	Antitoxin DinJ	<i>dinJ</i>	sigma70	NI	DinJ, YafQ, LexA	regulation of transcription, biofilm formation

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-2.69	P0A8U0	Protein syd	<i>syd</i>	NI	NI	NI	regulation of protein complex assembly
-2.69	P0AB24	Iron uptake system component EfeO	<i>efeO</i>	NI	NI	NI	ferrous iron transport
-2.58	Q59385	Copper-exporting P-type ATPase A	<i>copA</i>	NI	Cuer	NI	NI
-2.54	P0A6W5	Transcription elongation factor GreA	<i>greA</i>	sigma70, sigma24	NI	NI	DNA-template transcription, elongation
-2.54	P0A786	Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain	<i>pyrB</i>	NI	NI	ppGpp	'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process
-2.53	P76035	Uncharacterized protein YciW	<i>yciW</i>	sigma70	CysB	NI	NI
-2.53	P0A7A5	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	<i>pcm</i>	sigma70	NI	NI	protein methylation
-2.52	P0AFQ7	Uncharacterized deoxyribonuclease YcfH	<i>ycfH</i>	NI	NI	NI	DNA catabolic process
-2.52	P0AE01	tRNA (cytidine/uridine-2-O-)-methyltransferase TrmJ	<i>trmJ</i>	NI	NI	NI	tRNA nucleoside ribose methylation
-2.52	P31550	Thiamine-binding periplasmic protein	<i>thiB</i>	sigma70	NI	SgrR	thiamine transport
-2.52	P76316	D-cysteine desulphydrase	<i>dcyD</i>	NI	NI	NI	sulfur utilization
-2.51	P60752	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	<i>msbA</i>	NI	NI	NI	lipid transport
-2.50	P0AGF2	Uncharacterized SufE-like protein YgdK	<i>ygdK</i>	NI	NI	NI	iron-sulfur cluster assembly
-2.49	P0AF12	5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	<i>mtnN</i>	sigma70, sigmaS	NI	NI	L-methionine biosynthetic process
-2.48	P00448	Superoxide dismutase [Mn]	<i>sodA</i>	sigma70	Crp, MarA, Rob, SoxS	ArcA, Fnr, IhfB, IhfA, Fur	superoxide metabolic process
-2.48	P23367	DNA mismatch repair protein MutL	<i>mutL</i>	sigma32, sigma70	NI	NI	mismatch repair
-2.47	P0A8P6	Tyrosine recombinase XerC	<i>xerC</i>	sigma70	NI	NI	plasmid maintenance; Cell division, Chromosome partition, DNA integration, DNA recombination
-2.46	P62623	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	<i>ispH</i>	sigma32, sigma70	NI	NI	isoprenoide biosynthetic process
-2.45	P16700	Thiosulfate-binding protein	<i>cysP</i>	sigma70	CysB	H-NS	sulfate transport
-2.44	P50457	4-aminobutyrate aminotransferase PpuE	<i>puuE</i>	sigmaS	NI	ArcA-P, Crp, PpuR	gamma-aminobutyric acid metabolic process, putrescine catabolic process

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-2.43	P0ADB1	Osmotically-inducible lipoprotein E	<i>osmE</i>	sigma70, sigmaS	NI	Fis, IhfB, IhfA	response to osmotic stress
-2.43	P0A9T0	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>serA</i>	sigma70	Crp, Lrp	Lrp, Nac	L-serine biosynthetic process
-2.42	P0AGA2	Protein translocase subunit SecY	<i>secY</i>	NI	NI	DskA	intracellular protein transmembrane transport
-2.40	P0A6U8	Glycogen synthase	<i>glgA</i>	sigmaS, sigma70	Crp, PhoP, ppGpp	NI	glycogen biosynthetic process
-2.38	P61889	Malate dehydrogenase	<i>mdh</i>	sigma70	Crp, DpiA	ArcA, FlhC, FlhD	glycolytic process, tricarboxylic acid cycle
-2.38	P77316	Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein YbdR	<i>ybdR</i>	NI	NI	NI	oxidoreductase activity
-2.37	P69924	Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta	<i>nrdB</i>	sigma70	ArgP, Crp, Fis, DnaA	H-NS, NrdR, DnaA	DNA replication
-2.36	P07623	Homoserine O-succinyltransferase	<i>metA</i>	sigma70, sigma32	NI	MetJ	metabolic process
-2.35	P76423	Hydroxyethylthiazole kinase	<i>thiM</i>	NI	NI	NI	thiamine diphosphate biosynthetic process
-2.34	P0A6D7	Shikimate kinase 1	<i>aroK</i>	sigma70	NI	NI	aromatic amino acid biosynthetic process
-2.34	P0AE18	Methionine aminopeptidase	<i>map</i>	NI	NI	NI	proteolysis
-2.33	P08192	Bifunctional protein FolC;Folypolyglutamate synthase;Dihydrofolate synthase	<i>folC</i>	NI	NI	NI	dihydrofolate biosynthetic process
-2.33	P0A7T3	30S ribosomal protein S16	<i>rpsP</i>	sigma70	NI	DskA, Fnr	ribosomal small subunit assembly, translation
-2.32	P15770	Shikimate dehydrogenase	<i>aroE</i>	NI	NI	NI	aromatic amino acid biosynthetic process
-2.31	P23305	Uncharacterized protein YigA	<i>yigA</i>	sigma70	NI	NI	NI
-2.31	P16703	Cysteine synthase B	<i>cysM</i>	sigma70	CysB	H-NS	cysteine biosynthetic process
-2.31	P0AFY8	Negative modulator of initiation of replication	<i>seqA</i>	NI	NI	HupB-HupA	negative regulation of DNA-dependent DNA replication initiation
-2.30	P24215	Mannonate dehydratase	<i>uxuA</i>	sigma70	ciclicAMP-Crp	ExuR, OxyR, UxuR	D-glucuronate catabolic process, cellular response to DNA damage stimulus
-2.29	P00895	Anthranilate synthase component 1	<i>trpE</i>	sigma70	NI	trp-TrpR	tryptophan biosynthetic process

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-2.29	P0A6A0	Probable ubiquinone biosynthesis protein UbiB	<i>ubiB</i>	NI	NI	NI	regulation of ubiquinone biosynthetic process
-2.29	P0AG59	30S ribosomal protein S14	<i>rpsN</i>	NI	DskA		translation
-2.28	P00888	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Tyr-sensitive	<i>aroF</i>	sigma70	NI	tyrR	aromatic amino acid biosynthetic process
-2.28	P69490	Cytochrome c-type biogenesis protein CcmE	<i>ccmE</i>	sigma70	FhC, FhD, Fnr, ModE, NarP	NarL, NarP	heme transport, cytochrome complex assembled
-2.28	P76422	Hydroxymethylpyrimidine/phosphomet hylpyrimidine kinase	<i>thiD</i>	NI	NI	NI	thiamine diphosphate biosynthetic process
-2.27	P39286	Putative ribosome biogenesis GTPase RsgA	<i>rsgA</i>	NI	NI	NI	ribosomal small subunit biogenesis
-2.26	P0AAW1	Uncharacterized protein YbhP	<i>ybhP</i>	NI	NI	NI	NI
-2.25	P25888	ATP-dependent RNA helicase RhlE	<i>rhlE</i>	NI	NI	NI	ribosome assembly
-2.25	P77213	Carboxylate-amine ligase YbdK	<i>ybdK</i>	NI	NI	NI	cellular modified amino acid biosynthetic process
-2.25	P0A6C8	Acetylglutamate kinase	<i>argB</i>	sigma70	NI	ArgR	arginine biosynthetic process
-2.24	P0ABJ1	Ubiquinol oxidase subunit 2	<i>cyoA</i>	sigma70	Crp, GadE	ArcA, Cra, Fnr, Fur, PdhR	aerobic electron transport chain
-2.23	P0A720	Thymidylate kinase	<i>trk</i>	NI	NI	NI	dTDP biosynthetic process, nucleobase-containing small molecule interconversion
-2.22	P0A7F6	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme;	<i>speD</i>	sigma70	NI	NI	S-adenosylmethioninamine biosynthetic process, spermidine biosynthetic process
-2.21	P61714	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	<i>ribE</i>	sigma32, sigma70	NI	NI	riboflavin biosynthetic process
-2.21	Q46920	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	<i>queF</i>	NI	NI	NI	queuosine biosynthetic process
-2.20	P0AF03	Molybdopterin adenylyltransferase	<i>mog</i>	NI	NI	NI	mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process
-2.20	P0AES2	Glucarate dehydratase	<i>gudD</i>	NI	CdaR	NI	D-glucarate catabolic process
-2.19	P0ADW3	Putative cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 3	<i>yhcB</i>	NI	NI	NI	NI
-2.18	P0ABI4	Magnesium transport protein CorA	<i>corA</i>	sigma70	NI	NI	magnesium ion transport, metal ion transport

Fold Change	Uniprot	Nome da proteína	Gene	Promotor	Ativador	Inibidor	Função Biológica
-2.18	P0ADA5	Uncharacterized lipoprotein YajG	<i>yajG</i>	NI	NI	NI	plasma membrane
-2.16	P0A818	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	<i>rImH</i>	NI	NI	NI	rRNA base methylation
-2.16	P0AD10	Uncharacterized protein YecJ	<i>yecJ</i>	NI	NI	NI	NI
-2.15	P09030	Exodeoxyribonuclease III	<i>xthA</i>	sigmaS	NI	NI	DNA catabolic process, exonucleolytic
-2.14	P32662	Phosphoglycolate phosphatase	<i>gph</i>	sigma70	NI	NI	dephosphorylation
-2.13	P75959	N-acetyl-D-glucosamine kinase	<i>nagK</i>	NI	NI	NI	peptidoglycan turnover
-2.13	P26602	Chorismate--pyruvate lyase	<i>ubiC</i>	sigma70	NI	P-ArcA, Fnr, IhfA-IhfB, P-NarL	ubiquinone biosynthetic process, pyruvate biosynthetic process
-2.11	P75796	Glutathione import ATP-binding protein GsiA	<i>gsiA</i>	NI	NI	NI	glutathione transmembrane transport
-2.11	P0C8J8	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ	<i>gatZ</i>	sigma70	Crp	ArcA, GatR_1, GatR_2	galactitol metabolic process
-2.11	P31063	Uncharacterized lipoprotein YedD	<i>yedD</i>	NI	NI	NI	NI
-2.08	P37024	ATP-dependent RNA helicase HrpB	<i>hrpB</i>	NI	NI	NI	RNA processing
-2.08	P39408	Uncharacterized deoxyribonuclease YjJV	<i>yjJV</i>	NI	NI	NI	DNA catabolic process, nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis
-2.07	P40191	Pyridoxine kinase	<i>pdxK</i>	NI	NI	NI	pyridoxine biosynthetic process
-2.07	P27550	Acetyl-coenzyme A synthetase	<i>acs</i>	sigma70, sigmaS	Crp	Fis, IhfA, IhfB	acetate catabolic process, acetyl-CoA biosynthetic process from acetate
-2.04	P27828	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	<i>wecB</i>	sigma70	NI	nitric oxide-NsrR	enterobacterial common antigen biosynthetic process
-2.04	P76569	Uncharacterized protein YfgD	<i>yfgD</i>	sigma24	NI	NI	oxidation-reduction process
-2.02	P46130	Putative acyl-CoA thioester hydrolase YbhC	<i>ybhC</i>	NI	NI	NI	cell wall modification
-2.01	P0ADP0	Flavin mononucleotide phosphatase YigB	<i>yigB</i>	sigma70	NI	NI	riboflavin biosynthetic process, dormancy process
-2.01	P75797	Glutathione-binding protein GsiB	<i>gsiB</i>	NI	NI	NI	glutathione transmembrane transport

*Fold change representa a diminuição no acúmulo relativo de proteínas sob privação de nitrogênio em -NT2 em comparação com a condição +N. Função biológica, tipo de promotor, ativadores e repressores foram manualmente retirados do banco de dados Ecocyc.