

MARIANA SCHENATO ARAUJO



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ DE  
*Azospirillum brasilense***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda Satie  
Chubatsu

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira  
Pedrosa

CURITIBA

2003

MARIANA SCHENATO ARAUJO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ DE**  
***Azospirillum brasilense***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda Satie  
Chubatsu

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira  
Pedrosa

CURITIBA

2003

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA SCHENATO ARAUJO

### PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ DE *Azospirillum brasilense*

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu

Departamento de Bioquímica



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Departamento de Bioquímica



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Giseli Klassen

Departamento de Patologia Básica



Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos

Departamento de Bioquímica

Curitiba, 29 de abril de 2003

**Orientadores:**

**Dr<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu**

**Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Prof<sup>ª</sup>. Leda Satie Chubatsu, responsável pelo meu ingresso no mundo da Bioquímica e também pela orientação deste trabalho. Por seu apoio nos momentos de indecisão, por sua confiança em meu trabalho, por sua imensa compreensão e paciência, por seus ensinamentos... Obrigada!

Ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa agradeço a oportunidade de poder trabalhar no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio e também a sua constante colaboração em meus trabalhos.

Agradeço a todos os professores do Núcleo: Prof. Emanuel, Prof<sup>ª</sup>. M<sup>ª</sup>. Berenice, Prof<sup>ª</sup>. Roseli, Prof<sup>ª</sup>. Giseli, Prof<sup>ª</sup>. Liu, Prof<sup>ª</sup>. Cynthia, Prof<sup>ª</sup>. Elaine e Prof. Leonardo pela atenção, sugestões e amizade. Ao Prof. Geoff agradeço as correções e a atenção dispensadas. À Prof<sup>ª</sup>. Elaine agradeço também a ajuda nos experimentos com material radioativo.

À Rose Prado e à D. Ju eu agradeço a prestatividade e o carinho demonstrados. Em especial agradeço o Valter, sua constante ajuda foi fundamental no decorrer deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos do “laboratório 316” Lilian, Luíza, Luciano e Rose Adele por todos os momentos em que estivemos juntos, por toda a ajuda, dedicação, risadas e pela grande amizade.

Aos companheiros de laboratório, Ana C., Karen, André Luis, Ju S., Humberto, Ju Ramos, Ângela, Carol, Andréia, Ju Inaba, Patilene, Rafa, Marcelo, Stefan, Fabiane, Roberta, Lauren, Renata, Adriana T., Adriana I., Augusto, Helisson, Lysângela, Daniel L., Dani, Ana Paula, Fabrício, Marcos, Giovani, Gustavo, pelo convívio diário, ajuda e amizade.

Aos meus amigos da turma de mestrado 2001, agradeço os momentos de descontração e a amizade demonstrada. Ao Rodrigo, Didi, Ricardo, Renato, Carol M.,

Rosi... Enfim, a todos os grandes amigos do Departamento de Bioquímica agradeço o carinho.

Agradeço o apoio e auxílio da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e também a amizade de todos os demais professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao CNPq, PRONEX (FINEP, CNPq, MCT) e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Às minhas sempre amigas Ana Paula, Carolina, Fernanda e Luciana... Agradeço o carinho, os melhores momentos de descontração vividos desde o início da graduação, a cumplicidade, o afeto, enfim, agradeço de coração a nossa grande amizade!!!

Aos meus pais Maria Elena e Pedro eu agradeço o amor incondicional, o apoio e incentivo constante. Agradeço todos os dias por vocês serem meus pais... os melhores, sem dúvida, de todo o mundo. Aos meus irmãos Marina e Pedro Henrique agradeço o carinho e a paciência!!!!

Ao meu queri-marido Luiz Raphael... Agradeço por você existir na minha vida! Obrigada por seu amor infinito e pela família maravilhosa que você me deu! Te amo mais que tudo... para sempre.

Finalmente, porém de maior importância, agradeço a Deus... sem Ele percorrer este caminho teria sido impossível...

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO.....	1
1.2 O GÊNERO <i>Azospirillum</i> .....	1
1.3 O COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE .....	2
1.4 GENES <i>nif</i> .....	4
1.5 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO.....	5
1.6. SISTEMA Ntr.....	6
1.6.1 A cascata do sistema Ntr.....	7
1.7. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>nif</i> .....	10
1.8 AS PROTEÍNAS SINALIZADORAS DA FAMÍLIA P <sub>II</sub> .....	11
1.8.1 As proteínas GlnB, GlnK e GlnZ.....	15
1.8.2 Envolvimento das proteínas da família P <sub>II</sub> no sistema Ntr .....	16
1.8.3 Outras funções e comportamentos das proteínas P <sub>II</sub> .....	18
1.8.3.1 Heterotrimerização das proteínas P <sub>II</sub> .....	18
1.8.3.2 Proteínas P <sub>II</sub> e a atividade da proteína NifA.....	19
1.8.3.3 Controle da atividade da nitrogenase pelas proteínas P <sub>II</sub> .....	21
1.8.3.4 As proteínas da família P <sub>II</sub> e os sistemas de transporte de amônio.....	22
1.8.4 A estrutura das Proteínas GlnB e GlnK de <i>E. coli</i> .....	22
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS .....	27
3.2 MEIOS DE CULTIVO .....	27
3.3 ANTIBIÓTICOS .....	29
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOQUES BACTERIANOS .....	30
3.5 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL .....	30
3.6 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA .....	31
3.7 CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	31
3.8 PREPARO DOS VETORES.....	31
3.9 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR .....	32
3.10 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO .....	32
3.10.1 Preparo de Bactérias <i>Escherichia coli</i> Eletrocompetentes .....	32
3.10.2 Transformação Bacteriana .....	32
3.11 SELEÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	33
3.11.1 Extração e análise dos plasmídeos recombinantes .....	33
3.12 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES .....	34
3.12.1 Glicina SDS-PAGE.....	34
3.12.2 Tricina SDS-PAGE.....	34
3.13 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES.....	35
3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> EM <i>E. coli</i> .....	36
3.15 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE <i>Azospirillum brasilense</i> .....	37
3.16 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> .....	37
3.17 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.18 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.19 DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	40
3.20 URIDILILAÇÃO <i>in vitro</i> DA PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> UTILIZANDO ([ $\alpha^{32}$ P]-UTP).....	40

3.21 URIDILILAÇÃO <i>in vitro</i> DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> E ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTES.....	41
3.22 URIDILILAÇÃO <i>in vitro</i> DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> E ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GÉIS DESNATURANTES TRICINA SDS-PAGE.....	42
3.23 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> .....	42
3.24 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA A PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> .....	42
3.25 IMUNODETECÇÃO .....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
4.1 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES pMSA-3 E pMSA-4 .....	45
4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> EM <i>E. coli</i> .....	46
4.2.1 Expressão da Proteína GlnZ Nativa de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> BL21( $\lambda$ DE3)pLysS.....	49
4.2.2 Expressão da Proteína GlnZ Nativa de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> RB9065( $\lambda$ DE3) .....	52
4.2.3 Expressão da Proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> BL21( $\lambda$ DE3)pLysS.....	52
4.2.4 Expressão da Proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> RB9065( $\lambda$ DE3) .....	54
4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ-HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> .....	57
4.3.1 Purificação da proteína GlnZ nativa de <i>A. brasilense</i> .....	57
4.3.2 Purificação da proteína GlnZ-His de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	61
4.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>Escherichia coli</i> .....	66
4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>Escherichia coli</i> .....	68
4.6 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> .....	71
4.6.1 Uridililação <i>in vitro</i> da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> utilizando [ $\alpha^{32}$ P]-UTP.....	71
4.6.2 Uridililação <i>in vitro</i> da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> e Análise através de eletroforese de poliacrilamida não desnaturante .....	72
4.6.2.1 Efeito de diferentes fatores na uridililação da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> .....	74
4.6.2.2 Efeito da concentração da proteína GlnD de <i>E. coli</i> sob a uridililação da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> .....	76
4.6.3 Uridililação <i>in vitro</i> da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> e Análise em gel de poliacrilamida desnaturante Tricina SDS-PAGE.....	79

4.6.3.1	Efeito do Tempo de Incubação no processo de uridililação da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> pela proteína GlnD de <i>E. coli</i> .....	86
4.6.3.2	Efeito do ATP na uridililação da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> pela proteína GlnD de <i>E. coli</i> parcialmente purificada.....	86
4.6.3.3	Efeito da concentração de 2-cetoglutarato na uridililação da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> pela proteína GlnD de <i>E. coli</i> .....	88
4.6.3.4	Efeito da glutamina sob a uridililação da proteína GlnZ-His de <i>A. brasilense</i> pela proteína GlnD de <i>E. coli</i> parcialmente purificada.....	88
4.7	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> .....	89
4.8	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> .....	95
5.	CONCLUSÕES .....	99
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CONTROLE DO METABOLISMO GERAL DE NITROGÊNIO PELO SISTEMA <i>Ntr</i> EM <i>K. pneumoniae</i> .....	13
FIGURA 2	CONTROLE DO METABOLISMO GERAL DE NITROGÊNIO PELO SISTEMA <i>Ntr</i> EM <i>A. brasilense</i> .....	14
FIGURA 3	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS MONÔMEROS DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>E. coli</i> .....	25
FIGURA 4	ESQUEMA DA CLONAGEM DO GENE <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i> NO VETOR pET28a ORIGINANDO O PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-3 .....	47
FIGURA 5	ESQUEMA DA CLONAGEM DO GENE <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i> NO VETOR pET28a ORIGINANDO O PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-4 .....	48
FIGURA 6	ELETROFORESE DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>E. coli</i> BL21( $\lambda$ DE3) <i>pLysS</i> EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO pMSA-L1 .....	50
FIGURA 7	ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE <i>E. coli</i> BL21( $\lambda$ DE3) <i>pLysS</i> EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> EM A PARTIR DO PLASMÍDEO pMSA-4.....	51
FIGURA 8	ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE <i>E. coli</i> RB9065( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE <i>A. brasilense</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-L1 .....	53
FIGURA 9	ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE <i>E. coli</i> BL21( $\lambda$ DE3) <i>pLysS</i> EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-3 .....	55
FIGURA 10	ELETROFORESE DOS EXTRATOS CELULARES DE <i>E. coli</i> RB9065 ( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-3 .....	56
FIGURA 11	PADRÃO ELETRORÉTICO DE FRAÇÕES DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE <i>A. brasilense</i> OBTIDAS DURANTE SUA PURIFICAÇÃO NA COLUNA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE .....	58
FIGURA 12	PERFIL PROTEICO DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA HITRAP HEPARIN DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE <i>Azospirillum brasilense</i> .....	59
FIGURA 13	PERFIL ELETRORÉTICO DE UMA FRAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE <i>Azospirillum brasilense</i> PURIFICADA .....	60
FIGURA 14	ELETROFORESE DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> , NA COLUNA DE	

	AFINIDADE HI-TRAP CHELATING-NI <sup>+2</sup> , A PARTIR DE CÉLULAS <i>E. coli</i> BL21(λDE3)pLysS.....	62
FIGURA 15	ELETOFORESE DE UMA FRAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> PURIFICADA NA COLUNA DE AFINIDADE HITRAP-CHELATING-NI <sup>+2</sup> A PARTIR DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> BL21(λDE3)pLysS.....	63
FIGURA 16	PERFIL ELETOFORÉTICO DAS AMOSTRAS ELUÍDAS DA COLUNA HI-TRAP CHELATING NI <sup>+2</sup> DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> A PARTIR DA ESTIRPE RB9065(λDE3).....	64
FIGURA 17	PERFIL ELETOFORÉTICO DE UMA FRAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS PURIFICADA A PARTIR DE CÉLULAS RB9065(λDE3).....	65
FIGURA 18	ELETOFORESE DO EXTRATO CELULAR DE <i>E. coli</i> EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnD.....	67
FIGURA 19	PERFIL PROTEICO DAS AMOSTRAS ELUÍDAS NA COLUNA DEAE-SEPHAROSE DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> .....	69
FIGURA 20	PERFIL PROTÉICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DA PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> .....	70
FIGURA 21	AUTORADIOGRAFIA DO ENSAIO DE URIDILILAÇÃO <i>in vitro</i> DA PROTEÍNA GlnZ DE <i>A. brasilense</i> PELO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS DE <i>Azospirillum brasilense</i> E PELA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> PARCIALMENTE PURIFICADA.....	73
FIGURA 22	PERFIL DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> PELA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> PARCIALMENTE PURIFICADA FRENTE A DIFERENTES FATORES (ATP E 2-CETOGLUTARATO).....	77
FIGURA 23	EFEITO DO ATP E 2-CETOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> EM ELETOFORESE NATIVA PELA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> .....	78
FIGURA 24	PERFIL DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> FRENTE A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> PARCIALMENTE PURIFICADA.....	80
FIGURA 25	ANÁLISE QUANTITATIVA DA PORCENTAGEM DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> FRENTE A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> PARCIALMENTE PURIFICADA.....	81
FIGURA 26	URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE <i>A. brasilense</i> PELA PROTEÍNA GlnD DE <i>E. coli</i> NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE DIFERENTES MODULADORES E ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA TRICINA SDS-PAGE.....	84

FIGURA 27	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnD</i> DE <i>E. coli</i> NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnZ</i> -HIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> .....	85
FIGURA 28	EFEITO DO TEMPO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnZ</i> -HIS DE <i>A. brasilense</i> PELA PROTEÍNA <i>GlnD</i> DE <i>E. coli</i> .....	87
FIGURA 29	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnZ</i> -HIS DE <i>A. brasilense</i> PELA PROTEÍNA <i>GlnD</i> DE <i>E. coli</i> .....	90
FIGURA 30	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-CETOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnZ</i> -HIS DE <i>A. brasilense</i> PELA PROTEÍNA <i>GlnD</i> DE <i>E. coli</i> PARCIALMENTE PURIFICADA .....	91
FIGURA 31	EFEITO DA GLUTAMINA SOB A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnZ</i> -HIS DE <i>A. brasilense</i> PELA PROTEÍNA <i>GlnD</i> DE <i>E. coli</i> .....	92
FIGURA 32	COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA <i>GlnZ</i> DE <i>A. brasilense</i> COM SEQUÊNCIAS DE OUTRAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA <i>P<sub>II</sub></i> .....	96
FIGURA 33	ENSAIO DE RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PRODUZIDOS CONTRA A PROTEÍNA <i>GlnZ</i> -HIS DE <i>A. brasilense</i> .....	98

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	27
TABELA 2	ANTIBIÓTICOS .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP	[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] trifosfato de uracila
ADP	5' difosfato de adenosina
AMP	5' monofosfato de adenosina
Amp	Ampicilina
ATase	Enzima adenililtransferase
ATP	5' trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
DNA	Ácido desoxiribonucléico
D.O.	Densidade Óptica
DraG	Dinitrogenase reductase glicohidrolase
DraT	Dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
e-	Elétron
F	Faraday
FPLC	Cromatografia Líquida de Rápida Performance (Fast Performance Liquid Chromatography)
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamato sintase
GlnB-UMP	Proteína GlnB uridililada
GlnK-UMP	Proteína GlnK uridililada
GlnZ-UMP	Proteína GlnZ uridililada
GS	Glutamina sintetase
IPTG	$\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilo Dalton
k $\Omega$	Quilo Ohms

Km	Canamicima
kV	Quilo Volts
L	Litro
m/v	Massa por volume
nm	nanometros
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
Nal	Ácido nalidíxico
<i>nif</i>	Genótipo de capacidade de fixação de nitrogênio
Nif	Fenótipo de capacidade de fixação de nitrogênio
NtrC-P	Proteína NtrC fosforilada
N <sub>2</sub> ase	Nitrogenase
ORF	Sequência codificadora de proteína (Open Reading Frame)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
p/v	peso por volume
pb	Pares de base de nucleotídeos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Poli(etil)enoglicol
PMSF	α-toluenosulfonil fluoreto
<i>rbs</i>	Sítio de ligação do ribossomo (Ribosome Binding Site)
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Sm	Estreptomicina
Tc	Tetraciclina
TEMED	N, N, N', N' – tetrametil etilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano

U	Unidade enzimática
UMP	5' monofosfato de uracila

## RESUMO

*Azospirillum brasilense* é uma bactéria fixadora de nitrogênio encontrada em associação com diversas gramíneas de interesse agrícola como milho, trigo, sorgo e arroz. O processo da fixação biológica do nitrogênio neste microrganismo é altamente regulado tanto por amônia quanto por oxigênio. Uma das proteínas envolvidas na cascata de regulação da fixação de nitrogênio é a GlnB, produto do gene *glnB*. A proteína GlnZ, produto do gene *glnZ*, é uma paróloga de GlnB: GlnB e GlnZ possuem alta similaridade (66% identidade e 92% similaridade) porém funções distintas. Para a caracterização de GlnZ, o gene *glnZ* foi amplificado a partir do DNA genômico de *Azospirillum brasilense* e oligonucleotídeos sintetizados quimicamente com base na sequência do gene depositada no banco de dados GenBank. O fragmento amplificado foi clonado em vetores de expressão resultando em plasmídeos recombinantes que superexpressaram a proteína GlnZ na sua forma nativa ou com uma sequência contendo seis resíduos de histidina (His tag). A purificação da proteína GlnZ nativa foi realizada em dois passos cromatográficos. Primeiramente utilizou-se a coluna de troca iônica Q-Sepharose e em seguida a coluna de afinidade HiTrap Heparin, ambas conectadas a um sistema de FPLC. A proteína GlnZ-His foi purificada em apenas um passo cromatográfico, na coluna de afinidade HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup>. Ensaios de uridililação *in vitro* com a proteína GlnZ purificada foram realizados e mostraram que esta proteína é uridililada pelo extrato livre de células de *A. brasilense*, assim como pela proteína GlnD de *Escherichia coli* parcialmente purificada. A uridililação da proteína GlnZ-His parece ser dependente dos moduladores 2-cetoglutarato, ATP e UTP e é inibida por glutamina. Com a proteína GlnZ de *A. brasilense* purificada, anticorpos policlonais contra esta proteína foram produzidos. Esses anticorpos apresentaram uma alta especificidade tanto para a proteína GlnZ nativa quanto para sua forma His-tag.

## ABSTRACT

*Azospirillum brasilense* is a nitrogen-fixing bacterium found in association with several important crops such as maize, wheat, sorghum and rice. The nitrogen fixation process in this organism is highly regulated by both oxygen and ammonia. One of the proteins involved in the control of nitrogen fixation is GlnB, product of the *glnB* gene. The GlnZ protein, product of the *glnZ* gene, is a GlnB paralogue: GlnB and GlnZ show high similarity (66% of identity and 92% of similarity) but play different roles. To characterize GlnZ, the *glnZ* gene was amplified using genomic DNA of *A. brasilense* as the template and oligonucleotides chemically produced based on the gene sequence deposited in the GenBank. The fragment amplified was cloned into expression vectors resulting in recombinant plasmids which overexpressed GlnZ in either native form or with a histidine tag. The purification of native GlnZ was made in two FPLC steps: ion exchange Q-Sepharose chromatography followed by the affinity column HiTrap Heparin. The GlnZ-His tag protein was purified by a single chromatography step using a Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup> column. *In vitro* uridylylation assays with the purified GlnZ showed that this protein was uridylylated by a cell-free extract of *A. brasilense*, and also by a partially purified *Escherichia coli* GlnD protein. Uridylylation of the GlnZ-His tag protein was dependent on the modulators 2-ketoglutarate, ATP and UTP and was inhibited by glutamine. Polyclonal antibodies against the GlnZ protein were obtained and they recognized both the native GlnZ and GlnZ-His tag proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Como um constituinte de aproximadamente todas as biomoléculas, o nitrogênio é um elemento essencial para a vida. Quatro quintos da atmosfera terrestre é constituído por nitrogênio molecular ( $N_2$ ), a forma mais abundante deste elemento, porém, este é metabolicamente indisponível para a maioria dos seres vivos. Desta forma, o desenvolvimento de formas metabolicamente utilizáveis de nitrogênio é essencial para o crescimento e sobrevivência de todos os organismos.

Um grupo de microrganismos procarióticos, denominados diazotrofos, possui a habilidade de reduzir o dinitrogênio atmosférico a amônia, num processo conhecido como Fixação Biológica do Nitrogênio. Atualmente, este processo microbiano relacionado à agricultura está sendo bem estudado e explorado tecnologicamente, já que a produção de fertilizantes nitrogenados, uma outra forma de obtenção de nitrogênio biologicamente assimilável, é extremamente onerosa. Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações dos fertilizantes nitrogenados leva a uma melhoria da qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas.

### 1.2 O GÊNERO *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum*, pertencente à subclasse  $\alpha$  das proteobactérias (YOUNG et al., 1992), é constituído por bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de muitas gramíneas e cereais, como milho, trigo, sorgo, arroz, bananeira e abacaxizeiro, em todo o mundo, tanto em regiões temperadas quanto tropicais (DOBEREINER e DAY, 1976; DOBEREINER, 1991; CRUZ et al., 2001). Essas bactérias são Gram-negativas, de vida livre, microaerofílicas e altamente móveis, sendo que podem apresentar um único flagelo polar (quando crescidas em meio

líquido) ou também flagelos laterais (quando crescidas em meio sólido) (KRIEG e DOBEREINER, 1984). Sete espécies dentro do gênero *Azospirillum* já foram descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense* (DOBEREINER et al., 1978), *A. amazonense* (DOBEREINER et al., 1983), *A. halopraeferens* (DE LEY et al., 1987) e *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (DEKHIL et al., 1997) e *A. dobereineriae* (ECKERT et al., 2001).

Vários estudos de inoculação com o gênero *Azospirillum* demonstram que estas bactérias podem influenciar positivamente o crescimento vegetal, o rendimento agrícola e também o conteúdo de nitrogênio das plantas (citado em STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Estes efeitos positivos têm sido atribuídos a diversos mecanismos, entre eles a fixação biológica do nitrogênio e a produção de fitormônios, porém o mecanismo exato ainda não foi totalmente esclarecido (HOLGUIN, 1999).

Uma vez inoculadas às raízes vegetais, as bactérias *Azospirillum* induzem várias mudanças na morfologia e no comportamento do sistema radicular. Há um aumento visível no número e tamanho das raízes laterais favorecendo as trocas de nutrientes e água entre a planta e o solo. Isto resulta na promoção do crescimento vegetal (PEDROSA, 1988; OKON e VANDERLEYDEN, 1997). Uma explicação para esta observação seria a produção de fitormônios pelas bactérias, entre eles, as auxinas (TIEN et al., 1979). O ácido indol-acético (AIA) é quantitativamente o mais importante fitormônio produzido por *Azospirillum*. A produção de fitormônios pelas bactérias diazotróficas inoculadas parece ser a causa das mudanças morfológicas das raízes das plantas (JAIN e PATRIQUIN, 1985; OKON e KAPULNIK, 1986).

### 1.3 O COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE

A maquinaria bioquímica requerida para o processo da fixação biológica do nitrogênio é representada pelo complexo enzimático da nitrogenase. A nitrogenase é composta por duas metaloproteínas, a proteína Ferro (Fe) ou dinitrogenase redutase e a proteína Ferro-Molibdênio (MoFe) ou dinitrogenase (DEAN et al., 1993). A proteína

Fe é composta por duas subunidades idêntidas ( $\gamma_2$ ), codificadas pelo gene *nifH*, de aproximadamente 62 kDa, ligadas covalentemente a um núcleo 4Fe-4S (EADY, 1986; HOWARD e REES, 1994). A proteína Fe é a única e específica doadora de elétrons para a proteína FeMo, sendo que esta transferência está acoplada à hidrólise de ATP (HOWARD e REES, 1996). O sítio ativo para a redução do dinitrogênio está presente na proteína MoFe. Estruturalmente, a proteína MoFe é um tetrâmero ( $\alpha_2\beta_2$ ) com uma massa molecular total de aproximadamente 240 kDa, sendo que a subunidade  $\alpha$  (codificada pelo gene *nifD*) possui cerca de 55 kDa e a subunidade  $\beta$  (codificada pelo gene *nifK*) cerca de 60 kDa (HOWARD e REES, 1994; ROBERTS et al., 1978; KIM e REES, 1994). A proteína FeMo possui 2 átomos de molibdênio, 30 átomos de ferro e 32 átomos de enxofre organizados em dois tipos de centros redox: o núcleo P (FeS) e o cofator ferro-molibdênio (FeMoco) (SCHINDELIN et al., 1997; SMITH e EADY, 1992). O cofator FeMoco localiza-se no interior das subunidades  $\alpha$  e o par de centros P na interface entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (KIM e REES, 1994). Os elétrons passam da proteína Fe, anteriormente reduzida por um doador de elétrons (flavodoxina ou ferredoxina), para o núcleo P da proteína FeMo em um processo dependente de Mg.ATP. O núcleo P transfere então estes elétrons intramolecularmente ao cofator FeMoco que é responsável pela ligação e redução do substrato ( $N_2$ ) (HOWARD e REES, 1996).

Separadas, as proteínas Fe e FeMo não são capazes de catalizar o processo da fixação biológica do nitrogênio. Entretanto, quando juntas, na ausência de amônio, sob temperatura adequada, baixas tensões de oxigênio e fonte de poder redutor (elétrons) (POSTGATE, 1982) elas são responsáveis pela redução do dinitrogênio atmosférico a amônia seguindo a estequiometria estabelecida por SIMPSON e BURRIS (1984):



Devido ao elevado gasto energético desta reação, os diazotrofos regulam tanto a síntese do complexo enzimático da nitrogenase quanto a sua atividade em resposta a vários fatores ambientais, dentre eles, a tensão de oxigênio, já que a nitrogenase é bastante sensível ao O<sub>2</sub>, e a disponibilidade de nitrogênio fixado. O controle da expressão dos genes estruturais do complexo enzimático da nitrogenase é feita de maneira bastante intrincada, envolvendo várias cascatas de genes regulatórios.

#### 1.4 GENES *nif*

A organização dos genes *nif*, envolvidos na fixação de nitrogênio, segue diferentes padrões de acordo com o nível de adaptação ou fisiologia do organismo (MERRICK, 1992; PEDROSA et al., 2001).

Em *Klebsiella pneumoniae*, o diazotrofo melhor estudado, existem 20 genes *nif* organizados em 8 operons contíguos (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVW*, *nifZM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*) (MERRICK, 1988; 1989; 1992). Destes 20 genes identificados, pelo menos 14 são essenciais para a produção da nitrogenase ativa (MERRICK, 1988). Neste microrganismo, os produtos dos genes *nifLA* são responsáveis pela regulação da transcrição de todos os outros genes *nif*. A proteína NifA é a ativadora de transcrição atuando na ausência de amônia e oxigênio, enquanto que na presença destes, sua atividade é inibida pela proteína NifL (MERRICK, 1992).

Em *Azospirillum brasilense*, diferente do que ocorre em *K. pneumoniae*, os genes *nif* estão espalhados em regiões distintas do genoma (SINGH et al., 1989; GALIMAND et al., 1989; PASSAGLIA et al., 1991). Em *A. brasilense* foram isolados e sequenciados os genes *nifHDKTorf1nifY* que fazem parte de um único operon (QUIVIGER et al., 1982; de ZAMAROCZY et al., 1989; SCHRANK et al., 1987; PASSAGLIA et al., 1991). Aproximadamente a 3 kb a jusante do operon *nifHDKTorf1nifY* foram localizados os operons *nifENXorf3*, *orf2nifUSVorf4*, *fixABC* e *nifW* (GALIMAND et al., 1989; ELMERICH et al., 1988; FRAZZON et al. 1995; MILCAMPS et al., 1993) compreendendo uma região de aproximadamente 30kb.

Além destes genes, em outra região do genoma, foram identificados os genes *nifA*, *nifB* e *nifM* (LIANG et al., 1991; ELMERICH et al., 1997; FRAZZON et al., 1995). Em *Azospirillum brasilense* o gene *nifA* faz parte do operon monocistrônico *nifA* não havendo evidências para existência de um gene homólogo ao *nifL* neste microrganismo. Os genes *draT* e *draG*, que codificam as proteínas responsáveis pelo controle pós-traducional da nitrogenase, foram localizados a montante do operon *nifHDKTorf1nifY* (ZHANG et al., 1992).

## 1.5 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO

O amônio é o composto nitrogenado de mais fácil utilização na maioria dos procariotos e também aquele que proporciona a maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas (MERRICK e EDWARDS, 1995).

A amônia captada do meio extracelular ou obtida pelo processo de fixação de nitrogênio é assimilada na forma de glutamato e glutamina, compostos que servirão como doadores de nitrogênio para a biossíntese de compostos celulares nitrogenados. Dos dois sistemas envolvidos no processo de assimilação de amônio a glutamato e glutamina, aquele catalisado pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (MERRICK e EDWARDS, 1995) é o mais importante relacionado à regulação do processo de fixação de nitrogênio.

Em condições de baixa concentração de nitrogênio fixado, a amônia é assimilada na forma de glutamina que, posteriormente, dá origem a glutamato, conforme mostrado nas reações abaixo:



Este sistema é regulado através da atividade da enzima GS e é essencial para a manutenção da homeostase de nitrogênio intracelular. A atividade da enzima GS é controlada a nível da transcrição de seu gene (*glnA*), através da concentração de determinados metabólitos, ou por regulação covalente, através da adenilação de suas subunidades. A adenilação da enzima GS, realizada pela adenililtransferase (ATase ou GlnE), provoca a inativação da mesma e ocorre quando o nível intracelular de nitrogênio aumenta.

O segundo sistema de assimilação de amônio é catalisado pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) e somente é utilizado em condições de excesso de nitrogênio fixado. Quando comparada com o sistema de assimilação GS/GOGAT, cujo  $K_M$  é aproximadamente 0,1 mmol/L, o  $K_M$  da enzima GDH é alto (cerca de 1 mmol/L), desta forma, a enzima torna-se ineficiente na assimilação de amônio para o crescimento celular sob condições limitantes de nitrogênio (MERRICK e EDWARDS, 1995). A reação catalisada pela enzima GDH está abaixo representada:



## 1.6 SISTEMA Ntr

O sistema Ntr controla o metabolismo geral de nitrogênio, regulando a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (citado em DRUMMOND et al., 1983). Este sistema de transdução de sinal em resposta à presença de nitrogênio tem sido melhor estudado em *Escherichia coli* (MERRICK e EDWARDS, 1995; NINFA e ATKINSON, 2000). Em enterobactérias fazem parte do sistema Ntr as seguintes proteínas: NtrB (produto do gene *ntrB*), NtrC (produto do gene *ntrC*), GlnD ou Utase (produto do gene *glnD*), proteína GlnB (produto do gene *glnB*), GlnK (produto do gene *glnK*), GlnE ou ATase (produto do gene *glnE*) e glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*). Essas sete proteínas interagem em

um complexo mecanismo em cascata (MERRICK e EDWARDS, 1995), representado esquematicamente na Figura 1.

### 1.6.1 A cascata do sistema Ntr

Em *E. coli* a proteína GlnB desempenha um papel central no controle do sistema Ntr, interagindo com as proteínas GlnD, NtrB e GlnE e também com os efetores ATP e 2-cetoglutarato em resposta aos níveis celulares de nitrogênio e carbono (KAMBEROV et al., 1994; ATKINSON et al., 1994).

A proteína GlnD, com atividades de uridililtransferase e enzima removedora de uridilil, possui a função de sensores dos níveis de nitrogênio para o sistema Ntr através da relação celular de glutamina/2-cetoglutarato (ATKINSON et al., 1994). Esta enzima bifuncional catalisa a uridililação reversível da proteína GlnB (ADLER et al., 1975; BUENO et al., 1985; KAMBEROV et al., 1994). Em condições limitantes de  $\text{NH}_4^+$  a proteína GlnD possui atividade de uridililtransferase e catalisa a adição do grupo UMP à proteína GlnB, enquanto que em condições de excesso de  $\text{NH}_4^+$ , GlnD adquire atividade de enzima removedora de UMP (de MEL et al., 1994). A atividade de uridililtransferase de GlnD em *E. coli* requer 2-cetoglutarato e ATP e é inibida por glutamina, já sua atividade de enzima removedora de uridilil é ativada na presença de glutamina (KAMBEROV et al., 1994).

Em baixas concentrações de íons amônio, quando a relação 2-cetoglutarato/glutamina é alta, o 2-cetoglutarato induz uma mudança conformacional na proteína GlnB que adquire uma conformação favorável à sua uridililação pela proteína GlnD. A proteína GlnB-UMP não interage com a proteína NtrB que, então, catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. A proteína NtrC fosforilada (NtrC-P) é o ativador de transcrição dos operons *nifLA* e *glnAntrBC* em *K. pneumoniae* (REITZER e MAGASANIK, 1985). GlnB-UMP interage com a adenililtransferase (ATase) que catalisa a desadenilação da glutamina sintetase, ativando-a (BROWN et al., 1971; KAMBEROV et al., 1995; MERRICK e

EDWARDS, 1995). A glutamina sintetase desadenilada passa então a produzir glutamina (KEENER e KUSTU, 1988), situação em que a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  é máxima.

Em condições de excesso de nitrogênio fixado a proteína GlnD de *E. coli* liga glutamina, o que inibe sua atividade de uridililtransferase e ativa a de enzima removedora de UMP, favorecendo a desuridililação de GlnB (de MEL et al., 1994). A proteína GlnB desuridililada estimula a atividade de fosfatase da proteína NtrB, que desfosforila NtrC-P, inativando-a. Ao mesmo tempo, GlnB desuridililada age sobre a ATase, que passa a catalisar a adenililação da glutamina sintetase. A glutamina sintetase adenilada é inativa (MERRICK e EDWARDS, 1995). Neste caso, a principal via de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  passa a ser a glutamato desidrogenase (MERRICK e EDWARDS, 1995).

van HEESWIJK e colaboradores (1996) verificaram que na ausência da proteína GlnB em *E. coli*, em condições de limitação de nitrogênio, a enzima glutamina sintetase poderia ser desadenilada tão bem quanto na estirpe selvagem. Este resultado é explicado pela presença da proteína GlnK que, neste caso, substituiu funcionalmente GlnB. Assim como GlnB, a interação GlnK-ATase é inibida frente a altas concentrações de 2-cetoglutarato (JIANG e NINFA, 1999; ATKINSON e NINFA, 1999). A interação de GlnK com a proteína NtrB também é semelhante à GlnB (van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1999). Em *E. coli*, na ausência de GlnB, GlnK age através de NtrC para regular seu próprio promotor e outros promotores *ntr* (ATKINSON e NINFA, 1998). Em *K. pneumoniae*, a proteína GlnK é requerida para liberar a proteína NifA do efeito inibitório de NifL (JACK et al., 1999; HE et al., 1998). Em *Azotobacter vinelandii*, GlnK-UMP, em resposta a limitações de nitrogênio, previne o efeito inibitório de NifL sobre NifA (RUDNICK et al., 2002; LITTLE et al., 2000).

Na Figura 2 está representado um esquema do sistema Ntr em *Azospirillum brasilense*. Diferentemente do que ocorre nas enterobactérias, *A. brasilense* não possui a proteína NifL que é a proteína controladora de NifA. Neste organismo a proteína

NifA parece ser inibida diretamente por amônia e oxigênio (ARSENE et al., 1996). A proteína GlnB é requerida para a atividade de NifA. Mutantes de *A. brasilense*, contendo o gene *glnB* interrompido, apresentam fenótipo Nif negativo mesmo quando a proteína NifA é expressa constitutivamente (de ZAMAROCZY et al., 1996). Quando o domínio N-terminal da proteína NifA é deletado, a regulação por amônia e o requerimento da proteína GlnB desaparecem, sugerindo que esta região seja a responsável pelo sensoramento dos níveis de amônia (ARSENE et al., 1996).

Uma característica diferencial na via regulatória de *A. brasilense* é que mutantes *ntrC* e *ntrB* apresentam um fenótipo Nif positivo (LIANG et al., 1993; MACHADO et al., 1995). Diferentemente do que ocorre em *K. pneumoniae*, a transcrição do gene *nifA* de *A. brasilense* não depende de NtrC, ocorrendo na presença de oxigênio e amônia (FADEL-PICHETH et al., 1999). Esta resposta em *A. brasilense* sugere a existência de um mecanismo que controla a atividade da proteína NifA e parece envolver a proteína GlnB (LIANG et al., 1992). Em mutantes *glnB*, embora o gene *nifA* seja transcrito, a transcrição do gene *nifH* não ocorre, não havendo, portanto, a síntese do complexo da nitrogenase. Nestes mutantes, a proteína NifA de *K. pneumoniae*, na ausência de NifL, foi capaz de restaurar o fenótipo Nif positivo, enquanto que a proteína NifA de *A. brasilense* não restaura este fenótipo (de ZAMAROCZY et al., 1993). Isto indica que a proteína NifA de *A. brasilense* é expressa de uma forma inativa e que a proteína GlnB é requerida para sua ativação.

Em alguns microrganismos diazotróficos, como o *A. brasilense*, há um mecanismo de regulação pós-traducional da atividade da enzima nitrogenase. Em condições de excesso de  $\text{NH}_4^+$ , este mecanismo envolve a ADP-ribosilação reversível da proteína Fe do complexo da nitrogenase, catalisada pela enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase ou DRAT. A ADP-ribosilação da proteína Fe leva à sua inativação (MERRICK e EDWARDS, 1995; ZHANG et al., 1993). A atividade da proteína Fe é restaurada quando a concentração de amônio diminui pela remoção do grupamento ADP-ribosil da proteína Fe através da proteína DRAG ou dinitrogenase redutase glicohidrolase ativadora. Mutantes *ntrC* de *A. brasilense* são incapazes de

produzir esta resposta pós-traducional à nitrogenase, indicando que a proteína NtrC possa estar envolvida em algum passo do sistema sinalizador (PEDROSA e YATES, 1984; ZHANG et al., 1997). Em *A. brasilense* a proteína NtrC controla a expressão do gene *glnZ* (de ZAMAROCZY, 1998). O gene *glnZ* de *A. brasilense* codifica para a proteína GlnZ, descrita por de ZAMAROCZY e colaboradores (1996), e é similar ao gene *glnK* de *E. coli*. Em *A. brasilense* foi sugerida a participação da proteína GlnZ no controle da atividade da nitrogenase em resposta a amônia (KLASSEN et al., 2001).

### 1.7 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *nif*

A transcrição dos genes *nif* requer a proteína ativadora NifA e a holoenzima RNA polimerase- $\sigma^N$  (MERRICK, 1992). Esta transcrição ocorre através de promotores que possuem seqüências conservadas (par de dinucleotídeos GG e GC) nas regiões -25/-24 e -13/-12 em relação ao início de transcrição (MERRICK e CHAMBERS, 1992; FISCHER, 1994). O fator  $\sigma^N$  ou  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase não é capaz de ativar a transcrição sozinho, ele necessita de uma proteína ativadora que, no caso da fixação biológica do nitrogênio, é representada pela proteína NifA. Em conjunto com NifA, a RNA polimerase- $\sigma^{54}$  catalisa a formação do complexo aberto para o início de transcrição em uma reação dependente da hidrólise de ATP (BUCK et al., 1986; MORRET e BUCK, 1989; SANTERO et al., 1989; POPHAM et al., 1989; BUCK e CANNON, 1992; AUSTIN et al., 1990).

NifA é uma proteína cuja atividade é controlada pelos níveis de amônio e oxigênio na maioria dos diazotrofos. Em *K. pneumoniae*, um microrganismo da subclasse  $\gamma$  das Proteobactérias, a atividade de NifA é controlada por  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{O}_2$  através da proteína NifL (DIXON et al., 1997). Naqueles organismos aonde NifL não foi encontrada, como por exemplo, *A. brasilense* e *H. seropedicae*, o controle por  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{O}_2$  parece ser exercido pela própria proteína NifA (; FISCHER et al., 1988; ARSENE et al., 1996).

A transcrição do gene *nifA* depende de outra proteína ativadora, a proteína

NtrC. Em *K. pneumoniae*, o operon *nifLA* é ativado pela proteína NtrC fosforilada que é controlada pelo sistema Ntr (MERRICK, 1992). Assim como em *K. pneumoniae*, a transcrição do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae* é dependente de NtrC fosforilada e do fator  $\sigma^N$  (WASSEN et al., 2000). Esta transcrição é regulada por amônia mas independe dos níveis de oxigênio (SOUZA et al., 1999). Entretanto, em *A. brasilense*, a transcrição do gene *nifA* é independente de NtrC (LIANG et al., 1991; de ZAMAROCZY et al., 1993; MACHADO et al., 1995; FADEL-PICHET et al., 1999).

## 1.8 AS PROTEÍNAS SINALIZADORAS DA FAMÍLIA P<sub>II</sub>

As proteínas sinalizadoras P<sub>II</sub> fazem parte da mais ampla família de proteínas transdutoras de sinal da natureza conhecidas até o momento (NINFA e ATKINSON, 2000). Os genes que codificam para as proteínas da família P<sub>II</sub> foram encontrados em diversas classes bacterianas, em Archea e recentemente em plantas superiores. Estas proteínas ajudam a coordenar a assimilação de nitrogênio através da regulação da atividade de enzimas em resposta a diversos sinais dos níveis de carbono e nitrogênio celulares (NINFA E ATKINSON, 2000).

*E. coli* e outros membros da subclasse  $\gamma$  das Proteobactérias, como *K. pneumoniae*, possuem os genes codificadores das proteínas sinais GlnB e GlnK (HOLTEL e MERRICK, 1988; JACK et al., 1999). *Azotobacter vinelandii* e *Haemophilus influenzae* possuem apenas um gene que codifica para uma proteína tipo-P<sub>II</sub> (MELETZUS et al., 1998).

Dentro da subclasse  $\alpha$  das Proteobactérias, incluindo alguns membros dos gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Rhodobacter* e *Rhodospirillum*, dois genes que codificam para proteínas tipo-P<sub>II</sub> foram encontrados, os genes *glnB* (cotranscrito com *glnA*) e o *glnK* (*glnZ*) (formando um operon com *amtB*) (BOZOUKLIAN e ELMERICH, 1986; JOHANNSON e NORDLUND, 1996; KRANZ et al., 1990; MARTIN et al., 1989; MICHEL-REYDELLET et al., 1997, 1998; ZINCHENKO et al., 1994; KLIPP et al., 2000; PERLOVA et al., 1999; QIAN et

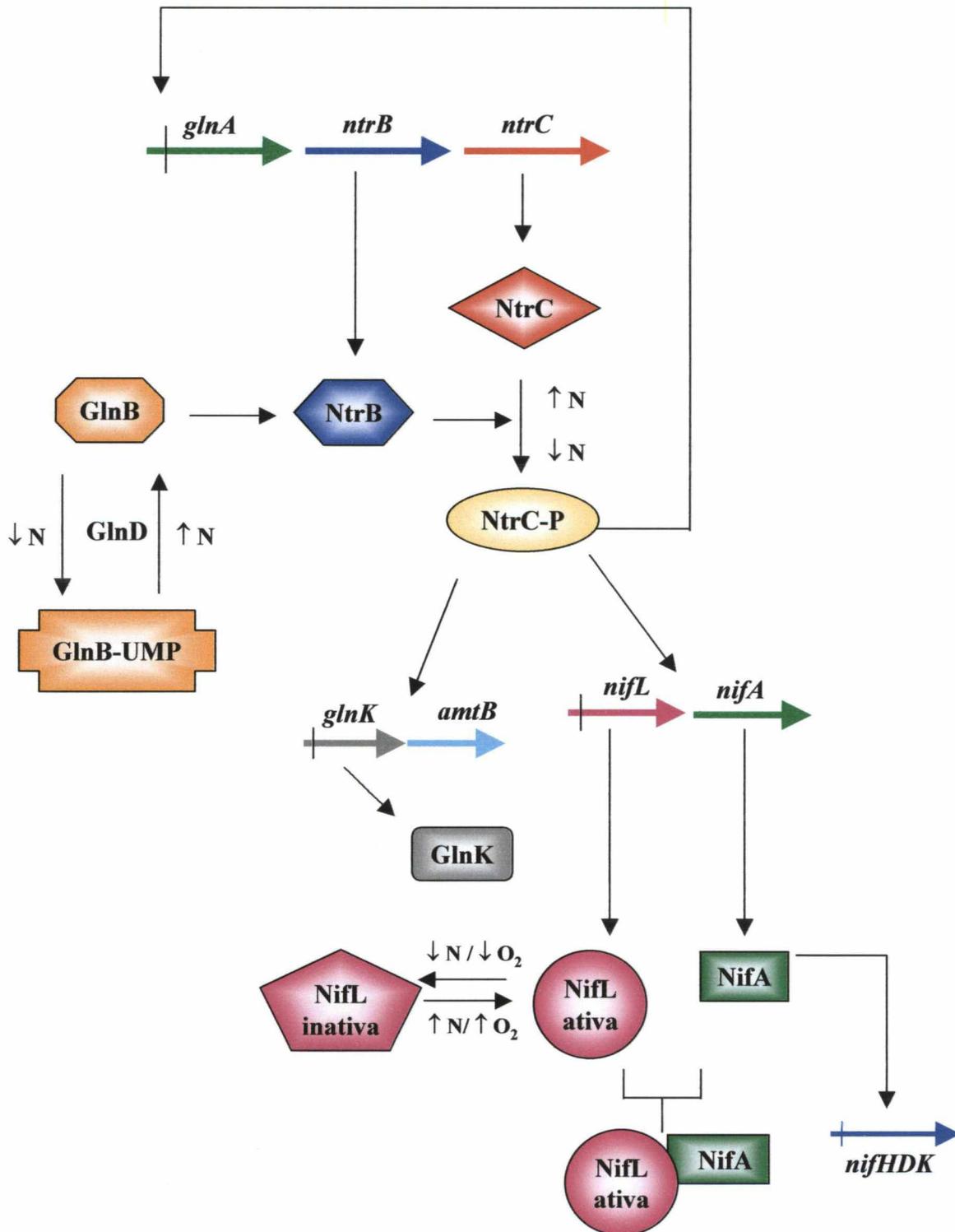
al., 1998; TATE et al., 1998). Em *Azospirillum brasilense* o gene similar a *glnK* foi denominado *glnZ* (de ZAMAROCZY, 1996).

Em *Herbaspirillum seropedicae* e *Azoarcus* sp., representantes da subclasse  $\beta$  das proteobactérias, também foram descritas proteínas tipo-P<sub>II</sub>. *H. seropedicae* possui dois genes tipo-P<sub>II</sub>, o *glnB* e o *glnK*, enquanto que no microrganismo *Azoarcus* sp. foram encontrados um gene homólogo a *glnB* e dois homólogos a *glnK* (BENELLI et al., 1997; NOINDORF, 2002; MARTIN et al., 2000).

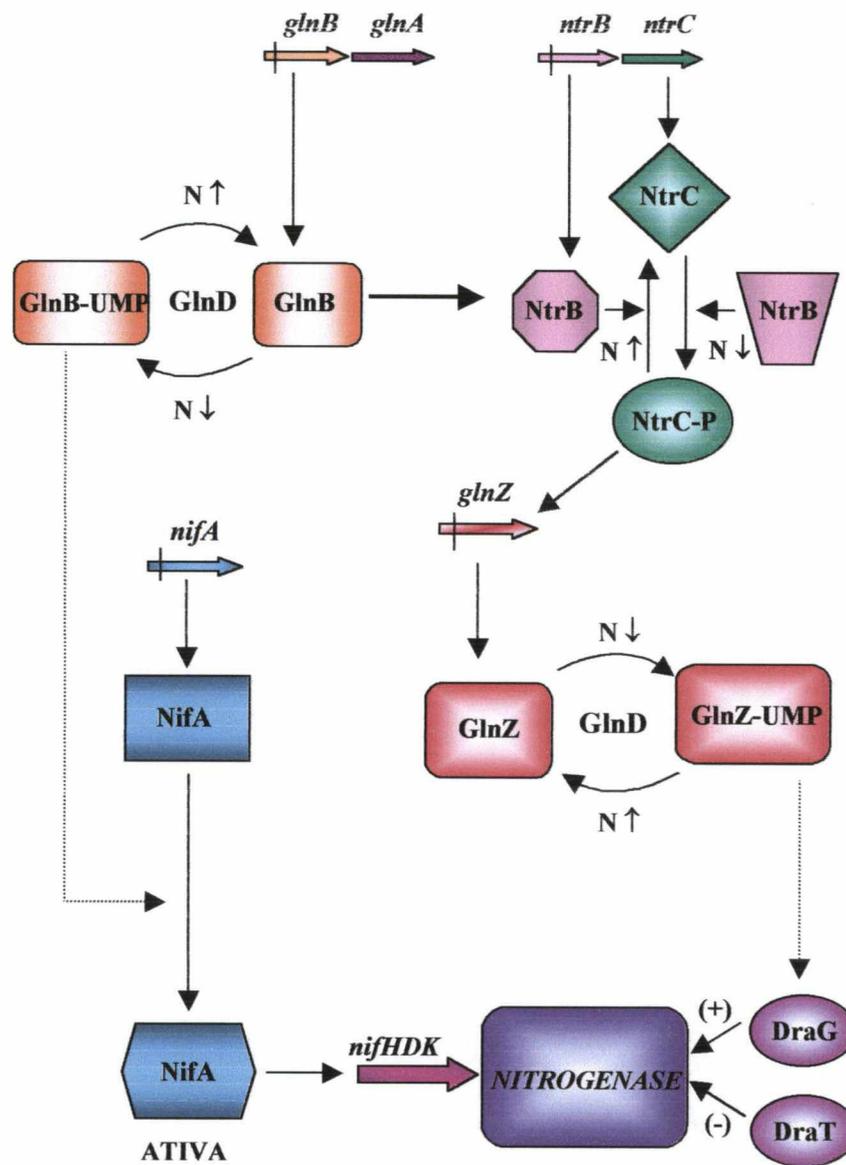
Em todas as arqueobactérias cujo genoma já foi seqüenciado múltiplas cópias de genes tipo-P<sub>II</sub> foram encontradas (THOMAS et al., 2000).

Dentro do reino vegetal, a primeira descoberta de um gene da família P<sub>II</sub> foi no genoma do cloroplasto da alga vermelha *Porphyra purpurea* (REITH e MUNHOLLAND, 1995). Entretanto, estudos recentes indicam que as proteínas P<sub>II</sub> estão provavelmente largamente distribuídas dentro das plantas superiores. Genes que codificam para proteínas tipo-P<sub>II</sub> têm sido identificados em *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, tomate e soja (HSIEH et al., 1998). Em todos estes casos, a seqüência da proteína tipo-P<sub>II</sub> encontrada possui alta homologia com a proteína bacteriana GlnB.

FIGURA 1 – CONTROLE DO METABOLISMO GERAL DE NITROGÊNIO PELO SISTEMA Ntr EM *K. pneumoniae* (ADAPTADO DE FISCHER, 1994)



Os símbolos  $\uparrow N$  e  $\downarrow N$  indicam, respectivamente, condições celulares de excesso e escassez de nitrogênio.  $\uparrow O$  e  $\downarrow O$  indicam, respectivamente, alta ou baixa pressão parcial de oxigênio no meio.

FIGURA 2 – CONTROLE DO METABOLISMO GERAL DE NITROGÊNIO PELO SISTEMA Ntr EM *A. brasilense*

Os símbolos  $\uparrow N$  e  $\downarrow N$  indicam, respectivamente, condições celulares de excesso e escassez de nitrogênio. (+) indica atividade da nitrogenase enquanto que (-) indica inativação da mesma. As linhas tracejadas indicam passos ainda não comprovados experimentalmente.

### 1.8.1 As proteínas GlnB, GlnK e GlnZ

As proteínas transdutoras de sinal GlnB, GlnK e GlnZ fazem parte do sistema regulador do metabolismo nitrogenado (Ntr), respondendo a variações na disponibilidade de nitrogênio e carbono intracelulares (NINFA e ATKINSON, 2000).

O gene estrutural da proteína GlnB, o gene *glnB*, foi primeiramente clonado e seqüenciado em *E. coli* por SON e RHEE (1987). Posteriormente, *glnB* foi isolado de diversos outros microrganismos. A sequência de aminoácidos deduzida do gene *glnB*, bastante conservada entre os diferentes organismos onde este gene foi encontrado, prediz um polipeptídeo com massa molecular de 12,4 kDa. Estudos posteriores demonstraram que, na forma nativa, a proteína GlnB apresenta-se como um homotrímero (CHEAH et al., 1994; de MEL et al., 1994; VASUDEVAN et al., 1994). O sítio de uridililação da proteína GlnB foi identificado como sendo o resíduo de tirosina 51 (SON e RHEE, 1987). Em *A. brasilense* e *H. seropedicae* a proteína GlnB é necessária para a atividade da proteína ativadora de transcrição NifA, entretanto não é necessária para a regulação da expressão ou atividade da glutamina sintetase (ARSENE et al., 1996; BENELLI et al., 2000).

Uma proteína paróloga de GlnB tem sido descrita em diversos organismos (de ZAMAROCZY et al., 1996; MICHEL-REYDELLET et al., 1998; QIAN e TABITA, 1998; TATE et al., 1998; van HEESWIJK et al., 1996). Esta proteína, denominada GlnK, parece desempenhar um papel distinto de GlnB dentro do metabolismo nitrogenado (ATKINSON e NINFA, 1999). Em enterobactérias, a proteína GlnK é prontamente uridililada pela proteína GlnD assim como a proteína GlnB, porém, sua desuridililação, quando os níveis celulares de nitrogênio aumentam, ocorre de maneira mais lenta (ATKINSON e NINFA, 1998; van HEESWIJK et al., 1996). Em *E. coli* e *K. pneumoniae* o gene *glnK* tem sua expressão controlada pelo sistema NtrB/NtrC, diferentemente do gene *glnB* cuja expressão é constitutiva (ATKINSON e NINFA, 1998; JACK et al., 1999; van HEESWIJK et al., 1996). É proposto que o papel de GlnK em enterobactérias seja o de controlar a atividade de

NtrB e ATase sob condições limitantes de nitrogênio (ATKINSON e NINFA, 1999). Em *K. pneumoniae* e em *A. vinelandii*, a proteína GlnK está envolvida no controle da atividade da proteína repressora NifL, embora sob mecanismos diferentes (HE et al., 1998; JACK et al., 1999; RUDNICK et al., 2002).

Em *A. brasilense*, a proteína paróloga a GlnB e similar a GlnK é denominada GlnZ (de ZAMAROCZY et al., 1996). Sua sequência de aminoácidos também é bastante similar com a sequência da proteína GlnB, assim como o tamanho provável do polipeptídeo codificado. A transcrição do gene *glnZ* é monocistrônica e iniciada principalmente a partir de um promotor dependente de  $\sigma^N$  ativado por NtrC (de ZAMAROCZY, 1998). Ocorre um aumento de 7,5 vezes na expressão de GlnZ em células cultivadas na ausência de amônio (de ZAMAROCZY, 1998). Surpreendentemente, a expressão de GlnZ é dependente do sistema Ntr mesmo em condições de excesso de amônio e é bastante aumentada na presença de aspartato (de ZAMAROCZY, 1998). Assim como sua paróloga GlnB, a proteína GlnZ é uridililada em níveis limitantes de nitrogênio e não é essencial para a modificação reversível da glutamina sintetase (GS), sugerindo a presença de uma terceira proteína da família P<sub>II</sub> neste organismo. Em *Rhodospirillum rubrum* e *Azoarcus sp.* foram caracterizados três genes que codificam três diferentes proteínas da família P<sub>II</sub> (MARTIN et al., 2000; ZHANG et al., 2001b).

A proteína GlnZ parece estar relacionada com o transportador de íons amônio (*amtB*) já que mutantes *glnZ* exibem uma taxa de transporte de íons metilamônio maior do que o selvagem. Por outro lado, quando o gene *glnZ* é superexpresso em *A. brasilense* a taxa de transporte de metilamônio diminui (de ZAMAROCZY e ELMERICH, 1997), sugerindo que mutações em *glnZ* possam interferir com a produção ou com o desencadeamento de sinais intracelulares para um dos sistemas de regulação da nitrogenase.

### 1.8.2 Envolvimento das proteínas da família P<sub>II</sub> no Sistema Ntr

Dentro do sistema Ntr, as proteínas P<sub>II</sub> interagem com quatro proteínas: NtrB, GS, GlnE (ATase) e GlnD (UTase). Nestes quatro casos, a sinalização dos níveis de nitrogênio e carbono celulares são fundamentais. Basicamente, três moléculas efetoras fazem este monitoramento, o ATP, o 2-cetoglutarato e a glutamina.

As proteínas da família P<sub>II</sub> podem ser modificadas covalentemente pela adição de UMP ao resíduo de tirosina 51 altamente conservado. A proteína GlnD ou UTase uridilila as proteínas GlnB e GlnK em resposta aos níveis intracelulares de nitrogênio. Esta interconversão das proteínas P<sub>II</sub> constitui um dos mais importantes mecanismos de sinalização intracelular dos níveis de nitrogênio. Vários estudos têm mostrado que a atividade de uridililtransferase de GlnD requer Mg<sup>2+</sup>, 2-cetoglutarato e ATP e é inibida por glutamina (ADLER et al., 1975; KAMBEROV et al., 1995). Por outro lado, a retirada do UMP necessita de glutamina (KAMBEROV et al., 1994; KAMBEROV et al., 1995; JIANG et al., 1998a).

Quando a proteína GlnB está uridililada ela não é capaz de interagir com a proteína NtrB favorecendo a fosforilação de NtrC (ATKINSON et al., 1994). NtrC ativa vai estimular a transcrição dos vários genes responsáveis pela regulação da fixação de nitrogênio que possuem promotores dependentes do fator  $\sigma^{54}$  (MORETT e SEGOVIA, 1993). A proteína GlnK, da mesma forma como GlnB, é capaz de interagir com NtrB e então regular a concentração de NtrC fosforilada (van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1999). Entretanto, GlnK é menos eficiente em reduzir o nível de NtrC-P (ATKINSON e NINFA, 1998) mas é capaz de regular promotores *ntr* dependentes de alta concentrações de NtrC-P (ATKINSON e NINFA, 1998; BLAUWKAMP e NINFA, 2002). Na ausência de GlnB, GlnK age através de NtrC para regular vários promotores *ntr*, inclusive o seu (ATKINSON e NINFA, 1998), porém, juntamente com a proteína GlnB, nenhuma condição de crescimento testada mostrou dependência de GlnK (ATKINSON e NINFA, 1998). Estes resultados indicam que a proteína GlnK possa agir na regulação fina de NtrB em condições limitantes de nitrogênio, condição na qual a proteína GlnK é expressa (ATKINSON e NINFA, 1999).

A atividade da glutamina sintetase, enzima responsável pela assimilação de nitrogênio celular, é regulada através de sua adenililação reversível catalisada pela enzima bifuncional adenililtransferase ou ATase, segundo os níveis celulares de 2-cetoglutarato e glutamina (BROWN et al., 1971; JIANG et al., 1998b). GlnB-UMP, encontrada na célula quando os níveis de nitrogênio são baixos, é necessária para a desadenililação (ativação) de GS (BROWN et al., 1971). A glutamina parece participar desta reação juntamente com GlnB de forma cooperativa (cooperatividade positiva) já que, em elevados níveis de glutamina, apenas uma pequena concentração de GlnB é necessária para ativar a atividade de adenililtransferase da ATase (JIANG et al., 1998b). Com relação ao 2-cetoglutarato, em altas concentrações deste modulador GlnB é incapaz de ligar-se a ATase impedindo a adenililação de GS, já em baixas concentrações a ligação da proteína GlnB com ATase é favorecida (JIANG e NINFA, 1999).

A proteína GlnK também é capaz de se ligar à ATase (van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1998). Assim como GlnB, altas concentrações de 2-cetoglutarato inibem a interação GlnK-ATase, porém, diferentemente de GlnB, baixas concentrações de 2-cetoglutarato não favorecem esta ligação (JIANG et al., 1998; ATKINSON e NINFA, 1999). van HEESWIJK e colaboradores (1996) mostraram que GlnK é cerca de 40 vezes menos potente que GlnB na ativação da adenililação de GS, sugerindo que, na presença de GlnB, GlnK não tem um papel fundamental no controle da atividade desta enzima. Estes resultados foram posteriormente confirmados por ATKINSON e NINFA (1999). Em *Azospirillum brasilense*, nem GlnB, nem GlnZ são essenciais para a modificação reversível da ATase (de ZAMAROCZY, 1998).

### 1.8.3 Outras funções e comportamentos das proteínas P<sub>II</sub>

#### 1.8.3.1 Heterotrimerização das proteínas P<sub>II</sub>

Em *E. coli*, as proteínas GlnB e GlnK são capazes de formar heterotrímeros

*in vivo* quando co-expressas de um plasmídeo ou quando a estirpe selvagem é crescida em condições limitantes de nitrogênio (FORCHHAMMER et al., 1999; van HEESWIJK et al., 2000). Quando o nível de nitrogênio celular está baixo o homotrímero (GlnB-UMP)<sub>3</sub> não é detectado. Por outro lado, são detectadas as espécies (GlnK-UMP)<sub>3</sub>, (GlnB-UMP)<sub>1</sub>-(GlnK-UMP)<sub>2</sub> e (GlnB-UMP)<sub>2</sub>-(GlnK-UMP)<sub>1</sub> já que em baixa concentração de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a expressão de GlnK é bastante acentuada (van HEESWIJK et al., 2000).

Experimentos de adenililação *in vitro* em *E. coli* demonstraram que os heterotrímeros GlnB-GlnK totalmente uridililados estimulam a atividade de desadenililação da ATase, porém de forma menos eficiente que o homotrímero (GlnB-UMP)<sub>3</sub>. (GlnK-UMP)<sub>3</sub> não é capaz de estimular a atividade de desadenililação de GS (van HEESWIJK et al., 2000). A estes heterotrímeros GlnB-GlnK têm sido propostas funções relacionadas com a regulação fina das cascatas transdutoras de sinal do metabolismo do nitrogênio (van HEESWIJK et al., 2000).

### 1.8.3.2 Proteínas P<sub>II</sub> e a atividade da proteína NifA

As primeiras indicações de que a proteína GlnB estaria relacionada com a atividade da proteína NifA provêm de observações em *A. brasilense* onde mutantes *glnB* exibem um fenótipo Nif negativo embora expressem NifA (LIANG et al., 1992). Por outro lado, mutantes *glnZ* não afetam a fixação de nitrogênio (de ZAMAROCZY, 1998). Esta relação GlnB-NifA não diz respeito à expressão do gene estrutural da proteína NifA e sim à manutenção da forma ativa da proteína NifA expressa, uma vez que GlnB estaria prevenindo o efeito inibitório de seu domínio N-terminal (ARSENE et al., 1996; ARSENE et al., 1999). Mutantes de *A. brasilense* no resíduo de Tyr51 da proteína GlnB também exibiram fenótipo Nif negativo, sugerindo que a forma de GlnB requerida para a ativação de NifA seja aquela modificada pelo grupamento UMP (ARSENE et al., 1999). Em *Herbaspirillum seropedicae*, assim como em *A. brasilense*, mutantes *glnB* também apresentaram fenótipo Nif negativo (BENELLI et

al., 1997). Estudos *in vivo* com a proteína NifA deste microrganismo indicaram que esta proteína é ativa quando expressa em *A. brasilense* sob baixas concentrações de oxigênio e amônia, entretanto, quando expressa em *E. coli*, NifA perde a sua atividade (SOUZA et al., 1999). Por outro lado, quando NifA N-truncada de *H. seropedicae* é expressa em *E. coli* e *A. brasilense* ela é ativa, indicando que o seu domínio N-terminal é altamente inibitório e regulado por nitrogênio. E ainda, quando expresso *in trans*, este domínio N-terminal inibe a atividade da proteína NifA truncada (MONTEIRO et al., 1999a; MONTEIRO et al., 1999b).

Em *K. pneumoniae*, estudos indicaram que as proteínas GlnB e GlnD não são essenciais para a regulação da atividade da proteína NifA mediada pela proteína inibitória NifL (EDWARDS e MERRICK, 1995; HOLTEL e MERRICK, 1988). Já que a proteína GlnB não está diretamente relacionada com o sistema NifLA de *K. pneumoniae*, EDWARDS e MERRICK (1995) sugeriram o envolvimento de uma proteína P<sub>II</sub> alternativa, a então proteína GlnK. HE e colaboradores (1997), demonstraram que a desrepressão da atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae* era dependente de NtrC sugerindo um papel para GlnK. Estudos posteriores em *E. coli* e *K. pneumoniae* confirmaram a função de GlnK na ativação de NifA mostrando que GlnK diminui o efeito inibitório de NifL sobre NifA sob condições de limitação de nitrogênio (HE et al., 1998; JACK et al., 1999). Esta modulação da atividade de NifA por NifL é dependente da concentração de GlnK na célula assim como das mudanças em sua atividade (ARCONDÉGUY et al., 1999). Em condições de limitação de nitrogênio a expressão de GlnK é aumentada e suficiente para promover a liberação de NifA. Este efeito independe do estado de uridililação da proteína GlnK e também é observado quando GlnK é expressa artificialmente em condições de excesso de amônia (ARCONDÉGUY et al., 1999). A proteína GlnB pode neutralizar a ação da proteína GlnK sobre NifL provavelmente pela formação de heterotrímeros entre GlnB e GlnK com conseqüente perda de função desta última (ARCONDÉGUY et al., 1999).

Em *A. vinelandii* a atividade inibitória de NifL sobre NifA parece ser estimulada pela forma não uridililada de GlnK, que interage com NifL (LITTLE et al.,

2000). A uridililação de GlnK parece prevenir a estimulação da atividade inibitória de NifL sobre NifA (RUDNICK et al., 2002).

### 1.8.3.3 Controle da atividade da nitrogenase pelas proteínas P<sub>II</sub>

Alguns diazotrofos também possuem a capacidade de controlar a atividade da nitrogenase, processo que envolve as proteínas do tipo P<sub>II</sub>.

A atividade da nitrogenase pode ser controlada a nível pós-traducional. Em vários microrganismos, incluindo *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum sphaeroides*, *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *Azotobacter chroococcum*, a nitrogenase pode ser inativada em resposta a aumentos transitórios nos níveis de nitrogênio intracelulares devido à ADP-ribosilação de um resíduo de arginina (Arg 101) de uma das subunidades da proteína Fe desta enzima (FU et al., 1989; LUDDEN e ROBERTS, 1989; MASEPOHL et al., 1993; ZHANG et al., 1997). Quando estes microrganismos são supridos com nitrogênio fixado eles são capazes de economizar energia desativando seu sistema de fixação de nitrogênio. Este processo é reversível e a nitrogenase pode ser reativada quando o nível de amônio diminui. Este mecanismo de ativação e inativação da nitrogenase, conhecido como “switch off/on”, envolve as enzimas DraT (dinitrogenase ADP-ribosil transferase) e DraG (dinitrogenase redutase glicohidrolase ativadora). DraT adiciona o grupamento ADP-ribosil na nitrogenase inativando a proteína Fe. DraG remove o grupamento ribosil da proteína Fe restaurando sua atividade (LUDDEN, 1994).

Existem indicações do envolvimento de proteínas tipo-P<sub>II</sub> no controle pós-traducional da nitrogenase. Em *R. capsulatus*, um duplo mutante *glnBglnK* é defeituoso no mecanismo de ADP-ribosilação da nitrogenase (KLIPP et al., 2000). Em *A. brasilense* e *R. rubrum* foi observado que mutações no sistema *ntrBC* alteraram a regulação da nitrogenase por amônio, provavelmente devido a mudanças na regulação da atividade da enzima DraG (PEDROSA e YATES, 1984; ZHANG et al., 1994; ZHANG et al., 1995). Nestes dois microrganismos foi sugerida a participação da

proteína GlnK/GlnZ e GlnB no controle da atividade da nitrogenase em resposta a amônio (KLASSEN et al., 2001; ZHANG et al., 2001a, b).

#### 1.8.3.4 As proteínas da família P<sub>II</sub> e os sistemas de transporte de amônio

Em vários microrganismos, o gene *glnK* faz parte de um operon com o *amtB*, gene envolvido com o transporte de amônio (THOMAS et al., 2000; ARCONDÉGUY et al., 2001). A transcrição conjunta dos genes *glnK* e *amtB* nos diversos organismos sugere que estas duas proteínas interajam fisicamente (THOMAS et al., 2000). THOMAS e colaboradores (2000) sugeriram que a proteína GlnK possa regular a atividade de transporte da proteína AmtB em resposta as necessidades celulares por amônio, ou a atividade de AmtB poderia atuar como um sinal de disponibilidade de amônio e modular o metabolismo de nitrogênio através do transdutor de sinal GlnK. COUTTS e colaboradores (2002) mostraram que a proteína GlnK, em *E. coli* e *A. vinelandii*, é capaz de ligar-se à membrana através da proteína AmtB agindo como um regulador negativo do transporte de amônio por esta proteína.

Em *A. brasilense* o gene *glnZ* (similar a *glnK*) não é co-transcrito com *amtB*, entretanto, de ZAMAROCZY (1998) observou que a proteína GlnZ inibe a captação de metilamônio. Além disso, mutantes *glnZ* de *A. brasilense* apresentam um aumento na captação de metilamônio, enquanto que a superexpressão de *glnZ* leva a uma diminuição desta captação (de ZAMAROCZY e ELMERICH, 1997).

#### 1.8.4 A estrutura das Proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*

A estrutura da proteína GlnB de *E. coli* foi determinada a 1,9 Å de resolução por CARR e colaboradores (1996). A proteína GlnB de *E. coli* é um homotrímero aonde cada monômero é composto por duas  $\alpha$ -hélices e seis folhas  $\beta$ -pregueadas. As duas  $\alpha$ -hélices e quatro folhas  $\beta$ -pregueadas formam um duplo motivo  $\beta\alpha\beta$  conectado por uma grande volta que se estende dos resíduos de aminoácidos Gly37 a Phe55. No ápice desta volta, denominada volta T, encontra-se o resíduo de Tyr51, o sítio de

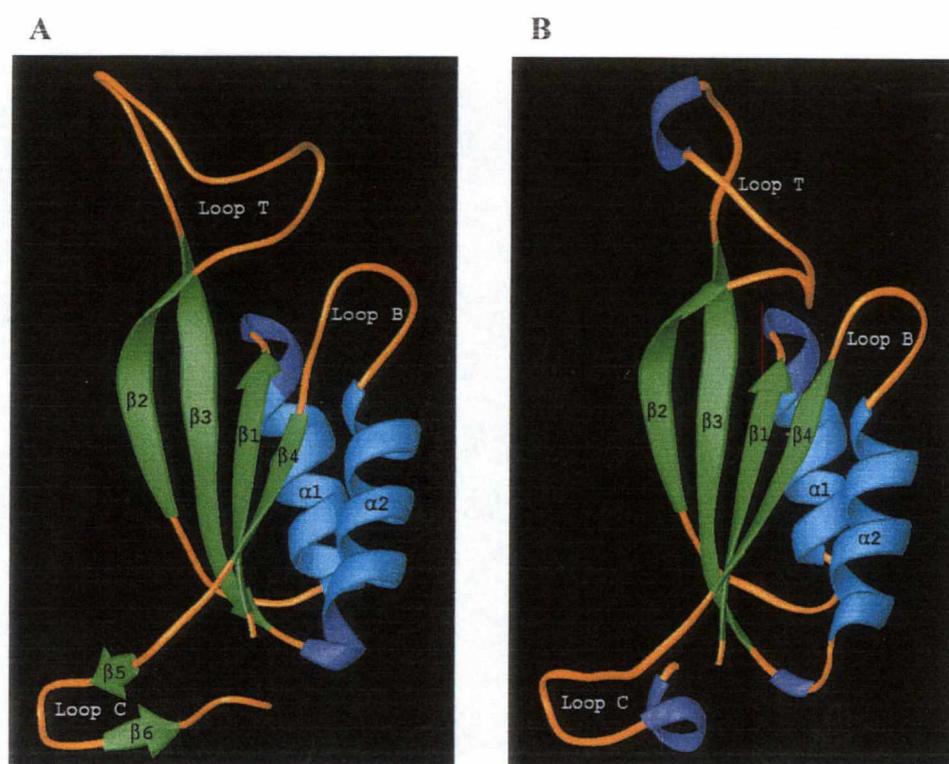
uridililação da proteína. Outras duas voltas são encontradas nestes monômeros: a volta B, que separa a segunda  $\alpha$ -hélice da quarta folha  $\beta$ -pregueada, e a volta C, que contém as folhas  $\beta$ -pregueadas 5 e 6 e correspondem à região C-terminal. O arranjo tridimensional destes monômeros resulta na formação de fendas laterais com grande significância funcional, sendo alvo de importantes interações regulatórias tais como aquelas com moléculas efetoras (ATP e 2-cetoglutarato) e receptores protéicos (CARR et al., 1996). No centro do trímero as seis fitas antiparalelas de três folhas  $\beta$ -pregueadas arranjam-se como uma superfície côncava fazendo com que a maior porção da proteína encontre-se empacotada como um barril achatado de 30 Å de altura. A cavidade central da proteína GlnB de *E. coli* possui, de maneira ordenada, inúmeras moléculas de água, sendo que também está sendo sugerida a presença de metais nesta região (CARR et al., 1996). A volta T da proteína GlnB de *E. coli* parece ser uma região essencial para a interação desta proteína com as outras proteínas do sistema Ntr NtrB, ATase e GlnD (JAGGI et al., 1996; JIANG et al., 1997). Contudo, conformações distintas da volta T podem ser requeridas por estas proteínas para aumentar as interações específicas entre elas e a proteína GlnB.

A proteína paróloga de GlnB de *E. coli*, a proteína GlnK, também teve sua estrutura tridimensional resolvida, porém a 2,0 Å de resolução (XU et al., 1998). Assim como GlnB, a proteína GlnK é homotrimérica, com um núcleo central bastante similar ao de sua paróloga. A maior diferença encontrada entre as estruturas das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* está presente na região da volta T. Na estrutura da proteína GlnK, entre os resíduos 47 e 49, há a presença de uma hélice  $3_{10}$  que não está presente na estrutura da proteína GlnB. Além disso, a volta T da proteína GlnK parece ser mais fechada no topo da cavidade central da molécula que a volta T da proteína GlnB. Nesta volta, assim como na proteína GlnB de *E. coli*, está presente o funcionalmente importante resíduo de Tyr 51, aquele que é uridililado pela proteína GlnD. As voltas B e C da proteína GlnK também diferem consideravelmente daquelas presentes na estrutura da proteína GlnB de *E. coli*. Estas voltas estão envolvidas na formação das fendas da molécula trimérica que são importantes na ligação de

pequenas moléculas efetoras ou também de proteínas. O ápice da volta B da proteína GlnK difere em 4,3 Å daquele da proteína GlnB, enquanto que a volta C de GlnK possui uma folha  $\beta$ -pregueada além de um pequeno motivo de hélice  $3_{10}$ .

A estrutura das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* também foram resolvidas quando estas se encontravam complexadas com o modulador ATP (XU et al., 1998; XU et al., 2001). Na proteína GlnK, o ATP liga-se em uma fenda lateral formada por dois monômeros adjacentes. Este sítio de ligação está flanqueando a volta B e a base da volta T. Nesta posição, o ATP pode influenciar a conformação da volta T.

Análises das relações entre estrutura e função das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* têm sido realizadas através do estudo de diversas mutações produzidas juntamente com as estruturas dos cristais disponíveis. A volta T da proteína GlnB de *E. coli* possui uma grande importância, como dito anteriormente, no que diz respeito à interação de GlnB com outras proteínas do metabolismo nitrogenado. Mutações em diferentes resíduos dentro da volta T da proteína GlnB de *E. coli* afetam a interação desta proteína com as outras proteínas com que ela interage, porém, duas destas mutações estudadas, G41A e A49P, eliminam completamente a interação de GlnB com a proteína GlnD e com a NtrB, respectivamente (JIANG et al., 1997). Mutações em resíduos conservados da volta B e na base da volta T da proteína GlnB de *E. coli* causaram modificações na interação desta proteína com as pequenas moléculas efetoras ATP e 2-cetoglutarato, além de interferir na ligação das outras proteínas receptoras GlnD, ATase e NtrB (JIANG et al., 1997). Este grupo de mutações, localizadas ao redor das fendas formadas pelas voltas T e B de um monômero juntamente com a volta C do monômero adjacente, corrobora a teoria de que esta estrutura desempenha um papel fundamental na interação da proteína GlnB com proteínas receptoras e moléculas ligantes.

FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS MONÔMEROS DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *E. coli*

Modelos estruturais dos monômeros das proteínas GlnB (A) e GlnK (B) de *E. coli* são apresentados. A estrutura secundária dos monômeros está apresentada em cores diferentes: folhas  $\beta$ -pregueadas em verde,  $\alpha$ -hélices em azul claro, hélices  $3_{10}$  em azul marinho e voltas T, B e C em laranja (CARR et al., 1996; XU et al., 1998).

## 2. OBJETIVOS

A complexidade do sistema de fixação biológica do nitrogênio em *Azospirillum brasilense* é marcante e existem vários pontos ainda não definidos dentro das cascatas sinalizadoras deste processo.

A proteína GlnZ de *A. brasilense* não tem seu papel no metabolismo nitrogenado ainda totalmente esclarecido, porém, é sabido que sua função difere do papel desempenhado por sua homóloga GlnB, uma das proteínas centrais do sistema Ntr. Considerando estas semelhanças estruturais e as diferenças funcionais apresentadas por estas proteínas, e ainda, a ausência de estudos *in vitro* com a proteína GlnZ de *A. brasilense*, os objetivos deste trabalho foram:

- Expressão e Purificação da proteína GlnZ de *A. brasilense* e a caracterização *in vitro* de seu processo de uridililação;
- Produção de anticorpos policlonais específicos para a proteína GlnZ de *A. brasilense*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 1.

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

ESTIRPES E PLASMÍDEOS	GENÓTIPO/FENÓTIPO	REFERÊNCIA/FONTE
<i>Azospirillum brasilense</i>		
FP2	Estirpe selvagem, Sp7, Nif <sup>+</sup> , Nal <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	PEDROSA E YATES, 1984
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(λDE3)pLysS	<i>hsdS gal (λcIts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7)	SAMBROOK et al., 1989
RB9065(λDE3)	<i>glnB2306, glnD99::Tn10</i> , Tc <sup>R</sup> (produtora da RNA polimerase do fago T7)	BENELLI et al., 2001
DH10B	Sm <sup>R</sup> , F <sup>-</sup> [ <i>proAB+ lacZΔM15</i> ]	SAMBROOK et al., 1989
Plasmídeos		
pT7-7	Vetor de expressão que contém o promotor do fago T7, Amp <sup>R</sup>	BIOLABS
pET28a	Vetor de expressão que gera proteína de fusão His-Tag, contém o promotor do fago T7, Km <sup>R</sup>	NOVAGEN
pMSA-L1	Vetor pT7-7 contendo o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i>	ARAUJO, 2000
pMSA-3	Vetor pET28a expressando <i>GlnZ</i> de <i>A. brasilense</i> fusionada a uma cauda de histidina.	Este trabalho
pMSA-4	Vetor pET28a expressando <i>GlnZ</i> de <i>A. brasilense</i> na sua forma nativa.	Este trabalho
pDOP1	Vetor pJLA503 contendo o gene <i>glnD</i> de <i>E. coli</i> sob controle dos promotores P <sub>L</sub> e P <sub>R</sub> do fago Lambda, Amp <sup>R</sup>	KAMBEROV et al., 1994

#### 3.2 MEIOS DE CULTIVO

Para o crescimento das estirpes de *Escherichia coli* foram utilizados os

meios de cultura Luria-Broth (LB) e Terrific-Broth (TB) (SAMBROOK et al., 1989).

O meio Luria-Broth (LB) apresentou a seguinte composição:

	<b>gramas/litro</b>
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

A partir da adição de ágar a este meio líquido, na concentração de 15g/L, o meio de cultura sólido foi obtido e denominado LA.

O meio Terrific-Broth (TB) apresentou a seguinte composição:

	<b>gramas/litro</b>
Extrato de levedura	24,0
Glicerol	4,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54

*A. brasilense* foi cultivado em meio NFbHP (MACHADO et al., 1991) o qual apresentou a seguinte composição:

	<b>gramas/litro</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,0 · 10 <sup>-1</sup>
NaCl	1,0 · 10 <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	2,0 · 10 <sup>-1</sup>
Ácido Nitrilo-triacético	5,6 · 10 <sup>-2</sup>
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,0 · 10 <sup>-2</sup>
Lactato de sódio	5,0

Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Soluções de fosfato e de cloreto de amônio (20 mmol/L) foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio frio no momento do uso. Quando completo o meio de cultura apresentou pH 6,8 e foi chamado NFbHPN.

O meio NFbHP sólido possuiu a mesma composição porém, acrescido de 1,5% (m/v) de ágar.

### 3.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos e respectivas concentrações finais utilizados para o cultivo de *Azospirillum brasilense* e *Escherichia coli* estão listados na tabela 2.

TABELA 2 - ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Abreviatura	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ácido nalidíxico	Nal	10 <sup>a,b</sup>
Ampicilina	Amp	200 <sup>b</sup>
Estreptomina	Sm	50 <sup>a</sup>
Canamicina	Km	50 <sup>b</sup>
Tetraciclina	Tc	20 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: *Azospirillum brasilense*

<sup>b</sup>: *Escherichia coli*

A solução estoque de tetraciclina foi preparada em 50% de etanol e armazenada na ausência de luz. As demais soluções estoque de antibióticos foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,22  $\mu\text{m}$ ). Todos os antibióticos foram mantidos a  $-20^\circ \text{C}$ .

### 3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOQUES BACTERIANOS

*Azospirillum brasilense* FP2 foi cultivado à temperatura de 30°C, enquanto que as estirpes de *Escherichia coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*, RB9065( $\lambda$ DE3) e DH10B foram cultivadas à 37°C.

O crescimento em meio líquido foi realizado sob agitação (130 rpm), mantendo-se a relação de 1/5 do volume da cultura para o volume total do frasco a fim de manter uma boa aeração durante o crescimento.

Estoques bacterianos foram mantidos em glicerol 50% (em água) e conservados a -20°C.

### 3.5 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O isolamento e a purificação de plasmídeos de *E.coli* em pequena escala foram feitos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Cinco mililitros de cultura de *E. coli* com o plasmídeo de interesse crescida em meio Luria Broth (LB) ou Terrific Broth (TB) durante a noite foram centrifugados em tubos plásticos de 1,5 mL. O sedimento de células de cada tubo foi ressuspensão em 100  $\mu$ L de GET (glicose 50 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L pH8,0 e EDTA 10 mmol/L pH8,0) e a lise celular efetuada com a adição vagarosa de 200  $\mu$ L de uma solução contendo SDS 1% (m/v) e NaOH 0,2 mol/L. DNA cromossomal, proteínas, restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 180  $\mu$ L de acetato de potássio 3 mol/L pH4,8 e incubação por 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e a solução aquosa foi extraída com 100  $\mu$ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com adição de 1 mL de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em 30  $\mu$ L de água contendo RNase na concentração final de 1  $\mu$ g/mL. O DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de ágar.

### 3.6 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose ou de ágar horizontal conforme descrito por MANIATIS e colaboradores (1982).

O tampão utilizado foi TAE 1x (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1 mmol/L pH8,0) e a concentração de agarose ou ágar variou de 0,7 a 1,5% (m/v) dependendo do tamanho do fragmento de DNA a ser analisado.

O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL). O perfil eletroforético foi registrado fotograficamente (SAMBROOK et al., 1989) ou utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado a equipamento de impressão a seco (GDS 5000).

### 3.7 CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As condições utilizadas para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram aquelas descritas por SAMBROOK e colaboradores (1989) ou as especificadas pelo fabricante.

Para a digestão de 0,2 - 1 µg de DNA foram utilizadas de uma a cinco unidades das diferentes enzimas de restrição (*NdeI*, *BamHI* ou *XbaI*) em um volume de 20 µL durante 4 horas na presença do tampão adequado e na temperatura ideal de funcionamento da enzima (37°C).

### 3.8 PREPARO DOS VETORES

Os vetores foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição adequadas. Após a digestão, as enzimas foram desnaturadas pelo calor ou por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA extraído foi precipitado com etanol absoluto, lavado, seco a vácuo e dissolvido em água (SAMBROOK et al., 1989).

### 3.9 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR

O vetor linearizado (item 3.8) foi ligado ao inserto de interesse numa proporção de 1:5 (mol). A estes foram adicionados tampão de ligação (50 mmol/L Tris-HCl pH7,6, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT, 0,5 mmol/L ATP e 5% de PEG 8000) e 0,8 U de T4 DNA ligase sendo então incubados durante a noite a 16°C. No caso de ligações com extremidades coesivas, a mistura vetor-inserto, antes da adição do tampão de ligação e da enzima, foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada em gelo (baseado em SAMBROOK et al., 1989).

### 3.10 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

#### 3.10.1 Preparo de Bactérias *Escherichia coli* Eletrocompetentes

Quinhentos mililitros de meio líquido LB foram inoculados com 5mL de uma cultura de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*, RB9065( $\lambda$ DE3) ou DH10B crescida durante 12h. A cultura foi incubada sob agitação constante a 37°C até atingir uma D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 e 1,0. Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo durante 30 minutos e centrifugada. As células foram lavadas com 500 mL (1x) e 250 mL (1x) de H<sub>2</sub>O estéril gelada e com 10 mL de glicerol 10%. O sedimento de células foi finalmente ressuspensão em 1 mL de glicerol 10% e fracionado em amostras de 40 $\mu$ L. As alíquotas foram armazenadas a -70°C.

#### 3.10.2 Transformação Bacteriana

Para transformação bacteriana, 1  $\mu$ L da amostra de DNA plasmidial previamente preparada (item 3.5) foi adicionado a 40  $\mu$ L da suspensão de células eletrocompetentes e mantido no gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) e submetidas a um campo elétrico (4 K $\Omega$ , 330  $\mu$ F) a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as

células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C, sob agitação, por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo o antibiótico de resistência do plasmídeo de interesse a fim de selecionar os transformantes.

### 3.11 SELEÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

O vetor pET28a apresenta um gene que confere resistência a canamicina, sendo este antibiótico adicionado ao meio de seleção das bactérias transformantes. Após a seleção, as colônias foram crescidas em meio LB ou TB contendo os antibióticos adequados. A análise dos plasmídeos recombinantes foi feita pelo método descrito por MONTEIRO e colaboradores (2001) ou através da digestão com as enzimas de restrição convenientes.

#### 3.11.1 Extração e análise dos plasmídeos recombinantes

Após a seleção das bactérias transformantes por canamicina, os plasmídeos recombinantes construídos no vetor pET28a foram analisados através do método descrito por MONTEIRO e colaboradores (2001).

As células contendo os plasmídeos a serem analisados foram crescidas durante a noite (em meio TB contendo os antibióticos adequados), coletadas por centrifugação e ressuspensas na solução RL (10% glicerol, 5 µg/mL RNase, 0,05% azul de bromofenol). A lise celular foi feita com a adição de SDS 2%. DNA genômico, proteínas e SDS foram precipitados pela adição de 0,25 mol/L de KCl. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi submetido à eletroforese em gel de ágar 1,2% em tampão TAE 1x. Este método permite a identificação de plasmídeos recombinantes pela comparação da taxa de migração, em gel de ágar, destes plasmídeos com o vetor sem inserto.

### 3.12 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES

#### 3.12.1 Glicina SDS-PAGE

As condições de eletroforese desnaturante glicina SDS-PAGE foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 12 mmol/L pH6,8; 5% glicerol; 0,4% de SDS; 2 mmol/L de 2-mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol) e fervidas por 3 minutos. Alíquotas de volumes variados foram aplicadas em gel de poliacrilamida (28% acrilamida e 2% bis-acrilamida). A concentração de poliacrilamida do gel separador foi variável (15% para a proteína GlnZ ou GlnZ-His ou 10% para a proteína GlnD) sendo este polimerizado em tampão contendo 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L pH8,8, 100 µL SDS 10% (m/v); 50 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) e 5µL de TEMED para um volume final de 10 mL. O gel empilhador (volume final de 5 mL) continha 4,0% de poliacrilamida, 3,0 mL Tris-HCl 0,5 mol/L pH6,8; 50 µL SDS 10% (m/v), 25 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) e 5µL de TEMED. As eletroforeses foram realizadas a 160V em tampão Tris 25 mmol/L pH8,3, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1% utilizando o sistema de minigéis da Hoefer.

#### 3.12.2 Tricina SDS-PAGE

O sistema de eletroforese desnaturante Tricina SDS-PAGE foi aquele descrito por SCHAGGER E VON JAGOW (1987) com pequenas modificações.

As amostras aplicadas nos géis foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 12mmol/L pH6,8; 5% glicerol; 0,4% de SDS; 2 mmol/L de 2-mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol) e fervidas por 3 minutos. A concentração de poliacrilamida (48% acrilamida e 1,5% bis-acrilamida) do gel separador foi de 25% sendo este polimerizado em 1 mL de tampão de gel (3 mol/L Tris-HCl pH8,45 e 0,3% SDS), 1 mL de glicerol 50%, 37 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) e 3,7 µL de TEMED em um volume final de 4 mL. O gel empilhador continha 4,0% de

poliacrilamida (48% acrilamida e 1,5% bis-acrilamida), 750  $\mu$ L de tampão de gel, 1,8 mL de água destilada, 20  $\mu$ L de persulfato de amônio 10% (m/v) e 2  $\mu$ L de TEMED.

As eletroforeses foram realizadas a 4°C primeiramente a 35V e, após cerca de 1 hora, a corrente foi aumentada para 15 mA (95 V) permanecendo assim por aproximadamente por 20 horas. Os tampões de corrida para o ânodo (+) (200 mmol/L Tris HCl pH8,9) e para o cátodo (100 mmol/L Tris, 100 mmol/L Tricina e 0,1% SDS) foram distintos. Todas as eletroforeses, utilizando este método desnaturante, foram realizadas no sistema MiniProtean da BioRad.

### 3.13 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES

Dois protocolos para a realização de eletroforeses não desnaturantes foram utilizados para a análise das diferentes isoformas da proteína GlnZ.

O primeiro foi baseado naquele descrito por LAEMMLI (1970) porém sem a adição de SDS nos géis de poliacrilamida (com concentração final de 10%) e tampões de corrida. Neste protocolo o tampão de amostra foi preparado sem 2-mercaptoetanol e SDS e as alíquotas a serem analisadas não foram submetidas à fervura antes da corrida eletroforética. As eletroforeses foram realizadas a 4°C, a 100V, por aproximadamente 6 horas.

O segundo protocolo foi descrito por FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC (1994). Esta metodologia é baseada naquela descrita por GOLDENBERG (1989) (sistema de tampões descontínuos) com a adição de 0,025% de Nonidet P-40 (concentração final) nos géis de separação e empilhamento.

As amostras protéicas foram diluídas em um tampão de amostra contendo 250 mmol/L de Tris-HCl pH6,9, 50% glicerol e 0,01% azul de bromofenol e aplicadas em gel de poliacrilamida. O gel separador continha 7,5% de acrilamida (30% acrilamida e 0,8% bis-acrilamida) polimerizada em 3 mL de tampão A 4x (150 mmol/L Tris HCl pH8,9), 3 mL de água destilada, 1 mL de Nonidet P-40 0,25%, 100

$\mu\text{L}$  de persulfato de amônio 10% (m/v) e 10  $\mu\text{L}$  de TEMED. A concentração do gel de empilhamento foi de 2,5% de acrilamida (10% acrilamida e 2,5% bis-acrilamida) polimerizada em 1,0 mL de tampão B 8x (50 mmol/L Tris  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH6.9), 4 mL de água destilada, 1 mL de Nonidet P-40 0,25%, 80  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio 10% (m/v) e 8  $\mu\text{L}$  de TEMED. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 100V em baixa temperatura (4°C), com tampão contendo Tris HCl (5 mmol/L pH8,3) e glicina (38 mmol/L), em sistema de minigéis da Hoefer.

### 3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ-HIS DE *A. brasilense* EM *E. coli*

Dez mililitros de meio LB foram inoculados com uma cultura de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* ou RB9065( $\lambda$ DE3) crescida durante a noite contendo os plasmídeos que expressam a proteína GlnZ de *A. brasilense* na sua forma nativa (pMSA-L1 e pMSA-4) ou fusionada a uma cauda de histidinas (pMSA-3). As células foram crescidas a 37°C sob agitação constante até D. O<sub>600</sub> aproximadamente igual a 1,0. Neste ponto foi adicionado o agente indutor IPTG (0,5 mmol/L) ou lactose (0,5% p/v), seguida de nova incubação por cerca de 4 horas a 37°C. Após esse período as células foram recuperadas por centrifugação.

Para a análise das proteínas, o sedimento de células transformadas com os plasmídeos correspondentes foi ressuspensão em 400  $\mu\text{L}$  de tampão (100 mmol/L KCl, 50 mmol/L Tris HCl pH8,0, 1 mmol/L DTT e 10% glicerol para a proteína GlnZ nativa e 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris HCl pH8,0, 10% glicerol e 1 mmol/L DTT para a proteína GlnZ-His) e as células lisadas através de sonicação utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma micropona em 6 ciclos de 20 segundos sob o gelo.

As proteínas foram analisadas através de eletroforeses em gel de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE) segundo procedimento descrito por LAEMMLI (1970).

### 3.15 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE *Azospirillum brasilense*

Quinhentos mililitros de meio LB foram inoculados com uma cultura de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* contendo o plasmídeo pMSA-L1, crescida durante a noite. As células foram crescidas a 37°C, sob agitação constante, até atingirem uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,0 quando foi adicionado 0,5% (p/v) de lactose. A cultura voltou a ser incubada por cerca de 4 horas. Terminado este período as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de sonicação (50 mmol/L Tris HCl pH8,0, 200 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA pH8,0, 20% glicerol). Logo após, 1 mmol/L de PMSF (inibidor de proteases) foi adicionado às células e estas foram sonicadas por 6 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto. O lisado foi incubado com sulfato de protamina (0,25 mg/mg de proteína) durante a noite no gelo para retirada de ácidos nucléicos e possíveis proteínas contaminantes. O lisado tratado foi centrifugado e a solução sobrenadante diluída 4 vezes com tampão C (50 mmol/L Tris HCl pH8,0 e 1 mmol/L EDTA). Esta preparação foi aplicada primeiramente em uma coluna de troca iônica (Q-Sepharose) de 30 mL, pré-equilibrada com tampão A (50 mmol/L Tris HCl pH8,0; 50 mmol/L KCl e 1 mmol/L EDTA), e conectada a um sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) (Pharmacia) operado a um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi lavada com tampão A e a proteína eluída com um gradiente de concentração de KCl de 0 a 1,0 mol/L (tampão B - 50 mmol/L Tris HCl pH8,0; 1,0 mol/L KCl e 1 mmol/L EDTA). Em seguida, as alíquotas com maior concentração de proteína GlnZ foram agrupadas e a amostra aplicada na coluna de afinidade HiTrap Heparin. Esta coluna, também conectada ao sistema FPLC, foi pré-equilibrada e lavada com o tampão A. A proteína GlnZ foi eluída novamente com um gradiente de concentração crescente de KCl conforme descrito anteriormente. Alíquotas de 3 mL foram coletadas e suas frações analisadas por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

### 3.16 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *Azospirillum brasilense*

A proteína GlnZ-His foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup>. A resina HiTrap Chelating-Ni<sup>2+</sup> foi preparada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (Pharmacia) e equilibrada com tampão de sonicação (50 mmol/L Tris HCl pH8,0, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT) contendo 10% de glicerol. Quinhentos mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* ou RB9065( $\lambda$ DE3) transformada com o plasmídeo pMSA-3 e crescida durante a noite. As células foram crescidas a 37°C sob agitação constante até atingirem uma D.O.<sub>600</sub> aproximadamente igual a 1,0. A indução da proteína GlnZ-His foi feita com 0,5% (m/v) de lactose ou com 0,5 mmol/L de IPTG a 37°C por 4 horas. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas no tampão de sonicação (50 mmol/L Tris HCl pH8,0, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 10% glicerol) para então serem sonicadas em 6 ciclos de 20 segundos, com 1 minuto de intervalo cada ciclo. Após sonicação a amostra lisada foi submetida a um tratamento com sulfato de protamina (0,25 mg/mg de proteína) por 3 horas no gelo. O lisado tratado foi centrifugado e a solução sobrenadante foi aplicada na coluna (1mL) de resina HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup>. A coluna foi lavada com 10 volumes de tampão 1 (50 mmol/L Tris HCl pH6,3 e 500 mmol/L NaCl), contendo 10 mmol/L imidazol e posteriormente com 10 volumes de tampão 2 de pH6,3 contendo 40 mmol/L de imidazol. A eluição da proteína GlnZ-His foi feita em tampão 3 (50 mmol/L Tris HCl pH8,0, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT) contendo 50, 100, 300 e 500 mmol/L de imidazol e 10% de glicerol. As proteínas purificadas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970) e armazenadas em alíquotas de 500  $\mu$ L em nitrogênio líquido. Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4°C.

### 3.17 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *Escherichia coli*

Para a superexpressão da proteína GlnD de *E. coli*, cinco mililitros de meio LB com ampicilina foram inoculados com 50 $\mu$ L de uma cultura de *E. coli* DH10B

contendo o plasmídeo pDOP1 crescida durante a noite a 30°C. Esta cultura permaneceu sob agitação constante por 8 horas a 30°C. Após este período, 100µL desta cultura foram reinoculados em 10 mililitros de meio LB-ampicilina e incubado a 30°C, por 12 horas. Após as 12 horas de incubação, 100µL desta cultura foram utilizados para inocular outros 10 mililitros de meio LB que foram incubados, sob agitação de 200 rpm, primeiramente por 2 horas a 30°C seguido por 4 horas a 42°C. Esta etapa de mudança de temperatura é fundamental uma vez que a indução da proteína se dá por choque térmico. Após este período as células foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em 500µL de tampão 1 (50 mmol/L Tris HCl pH7,5, 200 mmol/L KCl, 10% glicerol, 0,1 mmol/L DTT). As células foram lisadas por sonicação utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma microponta em 6 ciclos de 20 segundos sobre o gelo. As proteínas foram analisadas em géis glicina SDS-PAGE segundo protocolo descrito por LAEMMLI (1970).

### 3.18 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *Escherichia coli*

Para a purificação da proteína GlnD de *E. coli*, dois litros de meio LB foram inoculados com uma cultura preparada como descrito anteriormente (item 3.17) seguido por incubação, sob agitação de 200rpm, a 30°C por duas horas e em seguida por 4 horas a 42°C para a superexpressão da proteína GlnD. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em 10 mL de tampão 1 (50 mmol/L Tris HCl pH7,5, 200 mmol/L KCl, 10% glicerol, 0,1 mmol/L DTT). Lisozima (50 µg/mL) foi adicionada às células que permaneceram no gelo por 30 minutos. Após este período, a amostra foi submetida a sonicação em 5 ciclos de 30 segundos com 1 minuto de intervalo entre cada ciclo e, em seguida, tratada com sulfato de estreptomicina 2% sob agitação, por 30 minutos, a 0°C.

O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 18000 rpm e o sobrenadante diluído 4 x com o tampão 2 (50 mmol/L Tris HCl pH7,5, 10% glicerol, 0,1% DTT) para então ser aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. A coluna foi

lavada com 3 volumes de tampão A (50 mmol/L Tris HCl pH7,5, 50 mmol/L KCl, 10% glicerol, 0,1 mmol/L DTT) e a proteína GlnD eluída com um gradiente de KCl de 0,05 a 1 mol/L em tampão B (50 mmol/L Tris HCl pH7,5, 1 mol/L KCl, 10% glicerol e 0,1 mmol/L de DTT). As proteínas purificadas foram analisadas por eletroforese em géis SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970) e armazenadas em nitrogênio líquido. Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4° C.

### 3.19 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O sistema de reação continha 1mL do corante (solução de Bradford-Comassie Brilliant Blue G-250 (100 mg/L), etanol 95% e ácido fosfórico 85%) e 100 µL da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm determinada. A curva padrão foi realizada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como referência, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A sensibilidade desse método é de 1 a 10 µg de proteína.

### 3.20 URIDILILAÇÃO *in vitro* DA PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense* UTILIZANDO ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP)

As reações de uridililação foram realizadas utilizando-se um extrato livre de células de *A. brasilense* como fonte da proteína GlnD (uridililtransferase / enzima removedora de uridilil) ou a proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada. O extrato de *A. brasilense* foi preparado com células cultivadas em meio NFbHP contendo ou não 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio. As células, ao atingirem uma D.O.<sub>600</sub>  $\cong$  1,5, foram coletadas por centrifugação (7000 rpm por 5 minutos) e ressuspensas em 300µL de tampão de sonicação (imidazol 50 mmol/L pH7,6; KCl 200 mmol/L; glicerol 50%; PMSF 1 mmol/L; leucopectina 0,1 mg/L; pestatina 0,1 mg/mL). As células foram rompidas por sonicação (6 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto cada ciclo) e, após retirada do material insolúvel,

o lisado celular foi incubado com sulfato de estreptomicina 2% a 4°C por 30 minutos, sendo logo depois centrifugado a 18000 rpm por 30 minutos.

O sistema de reação (35µL) continha tampão de uridililação (Tris HCl 50 mmol/L pH7,6, KCl 10 mmol/L), 2-cetoglutarato 10 mmol/L, ATP 1 mmol/L, 0,1 mg/mL da proteína GlnZ (0,1 mmol/L), [ $^{32}$ P]-UTP (2,96.10<sup>9</sup> Bq/mmol) 0,8 mmol/L e GlnD de *E. coli* em concentrações variadas (0,005 µmol/L a 0,5 µmol/L) ou extrato celular de *A. brasilense* 0,5 mg/mL. As reações foram pré-incubadas a 37°C por 30 minutos e iniciadas pela adição do [ $^{32}$ P]-UTP. As reações foram interrompidas pela adição de 15µL de tampão de amostra (item 3.12.1). Alíquotas de 20 µL do sistema foram submetidas à eletroforese glicina SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970).

As proteínas foram coradas com Comassie Blue e o gel seco e autoradiografado utilizando um filme de raios-X (Kodak, X-OMAT).

### 3.21 URIDILILAÇÃO *in vitro* DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* E ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTES

Os ensaios de uridililação *in vitro* com as proteínas GlnZ e GlnZ-His de *A. brasilense* também foram realizados sem a utilização do UTP marcado radioativamente. Para a análise da uridililação utilizou-se géis não desnaturantes que possibilitam a separação das isoformas da proteína GlnZ (GlnZ livre ou uridililada). Os protocolos de géis não desnaturantes foram aqueles descritos anteriormente (item 3.13).

Nestes ensaios o sistema de reação (15µL) continha 0,1 mg/mL de proteína GlnZ His-tag (3 µmmol/L), 0,1 mmol/L de ATP, 1 mmol/L de UTP, 10 mmol/L de 2-oxoglutarato, 1 tampão de uridililação 10x (100 mmol/L Tris HCl pH7,5, 100 mmol/L KCl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT) e concentrações variadas de proteína GlnD de *E. coli*. As reações foram incubadas a 30°C por 30 minutos e interrompidas com 1 mmol/L de EDTA juntamente com o tampão de amostra. Todo o conteúdo das reações

foi submetido à eletroforese não desnaturante.

### 3.22 URIDILILAÇÃO *in vitro* DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* E ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GÉIS DESNATURANTES TRICINA SDS-PAGE

Uma outra maneira de analisar a uridililação da proteína GlnZ é através da utilização de géis desnaturantes tricina SDS-PAGE (item 3.12.2). Este sistema permite a separação de pequenas proteínas (1 a 100 kDa) especialmente com uma maior resolução na faixa de 5 a 20 kDa. No caso da uridililação, a presença do grupamento UMP (com massa molecular de aproximadamente 250 Da) ligado à proteína GlnZ faz com que esta migre mais lentamente separando-a da proteína GlnZ não modificada.

As reações de uridililação e a metodologia do ensaio são as mesmas descritas no item 3.21. Após o período de incubação por 30 minutos a 30°C, todo o conteúdo da reação foi submetido à eletroforese desnaturante tricina SDS-PAGE conforme descrito no item 3.12.2.

### 3.23 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *Azospirillum brasilense*

A porcentagem de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* foi determinada após densitometria dos géis de poliacrilamida resultantes de cada experimento realizado e da análise da intensidade das bandas pelo programa FragmeNT Analysis (Molecular Dynamics Version 1.1a).

### 3.24 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA A PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense*

Dois protocolos distintos foram utilizados para a produção de anticorpos policlonais contra a proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense*. Em ambos foram

realizadas quatro imunizações mensais em coelho, porém, a forma da proteína GlnZ injetada no coelho foi diferente.

A primeira metodologia utilizou glutaraldeído para a formação de agregados da proteína GlnZ. Aparentemente, a formação de agregados protéicos aumenta a resposta imune podendo se obter um soro com o título de anticorpos maior. Uma solução de 0,2% de glutaraldeído em PBS (tampão salina fosfato pH7,2) foi adicionada em igual volume em uma solução de 1 mg/mL de proteína GlnZ-His também em PBS. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora sendo então adicionado a ela 150 µL de etanolamina. Esta mistura foi dialisada contra PBS a 4°C por três vezes para ser finalmente injetada, intradermicamente, em coelho. Este procedimento foi repetido nas três primeiras injeções com intervalos de 30 dias, sendo a última feita somente com a proteína GlnZ-His purificada.

No segundo protocolo, a primeira injeção intradérmica no coelho continha aproximadamente 500 µg da proteína GlnZ-His purificada juntamente com o adjuvante completo de Freund para que houvesse um aumento da resposta imune. Na segunda e terceira injeções a proteína GlnZ-His purificada (1 mg) foi injetada no coelho com o adjuvante incompleto de Freund e, após 30 dias, a última injeção realizada continha somente a proteína GlnZ-His purificada.

Dez dias após a última imunização, independentemente do protocolo realizado, o sangue do coelho foi coletado (10 mL), seu soro separado e armazenado a -20°C. Os anticorpos obtidos foram analisados pela técnica de Imunodeteção (BURNETTE, 1981).

Anticorpos não específicos para a proteína GlnZ-His foram removidos por tratamento com extrato livre de células da estirpe BL21(λDE3)*pLysS*, transformadas com o vetor pET28a e induzidas sob as mesmas condições para a expressão da proteína GlnZ-His. Este extrato foi adsorvido em membrana de nitrocelulose por cerca de 8 horas e, após este período, essa membrana foi incubada com os anticorpos diluídos em leite desnatado (1:100) por 12 horas. Após esta incubação, os anticorpos presentes na solução foram utilizados nos ensaios.

### 3.25 IMUNODETECÇÃO

O método utilizado para a análise dos anticorpos produzidos em coelhos foi aquele descrito por BURNETTE (1981). Uma eletroforese (glicina SDS-PAGE) contendo amostras de proteínas de interesse foi feita em gel de poliacrilamida 15%. Após a corrida, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (tampão de corrida de glicina SDS-PAGE em presença de 20% de metanol) por cerca de 10 minutos. O equipamento para a transferência (BioRad) foi montado e o gel foi colocado em contato com uma membrana de nitrocelulose. A transferência das proteínas foi feita por uma hora a 150 mA. Após a transferência das proteínas, a membrana foi incubada por duas horas em TBS (50 mmol/L Tris HCl pH8,0; 150 mmol/L NaCl; 0,002% Tween 20) com 5% de leite desnatado, a fim de bloquear a membrana. Após este período foi adicionado o anticorpo de interesse (soro do coelho imunizado) em uma diluição de 1:500 em tampão TBS-5% leite. Essa incubação do anticorpo foi feita sob agitação constante durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS por 5 minutos cada. Após estas lavagens, a membrana foi novamente incubada, agora com um segundo anticorpo, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, diluído 1:10000 em TBS-5% leite por 2 horas. Novamente, após a incubação, a membrana foi lavada por três vezes com TBS. Terminadas as lavagens, a revelação da membrana foi realizada por quimioluminescência utilizando o kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Life Science) e em seguida a membrana foi exposta contra um filme de raios-X (Kodak, X-Omat).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES pMSA-3 E pMSA-4

Em 1996, de ZAMAROCZY e colaboradores isolaram um gene homólogo ao gene *glnB* em *A. brasilense*, o gene *glnZ*. A sequência de aminoácidos da proteína GlnZ, deduzida da sequência de nucleotídeos do seu gene estrutural, é bastante similar à sequência da proteína GlnB (82% de similaridade). Experimentos com estirpes mutantes demonstraram estas proteínas desempenham funções distintas dentro do sistema regulatório da fixação biológica do nitrogênio em *A. brasilense* (de ZAMAROCZY, 1998).

Com a sequência de nucleotídeos do gene *glnZ* de *A. brasilense* depositada no banco de dados GenBank (sob o número de acesso X92496), oligonucleotídeos específicos para as regiões 3' e 5' do gene foram sintetizados quimicamente e, através de reações de PCR utilizando como molde o DNA genômico deste microrganismo, o gene *glnZ* pode ser amplificado em larga escala (ARAUJO, 2000). Os fragmentos amplificados foram clonados nos vetores pT7-7 e pTZ19R dando origem, respectivamente, aos plasmídeos recombinantes pMSA-L1 e pMSA-2. Estes dois plasmídeos foram sequenciados, a fim de confirmar a sequência do fragmento clonado, e submetidos a alguns testes preliminares de indução na tentativa de otimizar as condições de superexpressão da proteína GlnZ na sua forma nativa (ARAUJO, 2000).

Na tentativa de otimizar a posterior purificação desta proteína, o gene *glnZ* de *A. brasilense* foi também clonado no vetor de expressão pET28a. Este vetor possui algumas características importantes no que diz respeito à expressão e purificação de proteínas. Assim como o pT7-7, este vetor possui o promotor forte do fago T7 controlando a transcrição, sendo possível obter uma alta taxa de expressão da proteína de interesse após indução. Diferente do pT7-7, o vetor pET28a codifica para um oligopeptídeo contendo seis resíduos de histidinas que fica fusionado na região N-

terminal da proteína expressa. Esta sequência, denominada cauda de histidinas (His-tag), possibilita a purificação da proteína expressa em apenas um passo cromatográfico, em uma coluna de afinidade, aumentando a eficiência e o rendimento do processo.

Para clonar o gene *glnZ* no vetor pET28a, o plasmídeo recombinante pMSA-L1 foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e o fragmento obtido subclonado no vetor pET28a dando origem ao plasmídeo recombinante pMSA-3. Este plasmídeo expressa a proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense* fusionada a uma cauda de histidinas e, neste trabalho, será denominada GlnZ-His (Figura 4).

Considerando a maior eficiência de expressão no vetor pET28a, uma construção que permitisse a expressão da proteína GlnZ nativa a partir deste vetor também foi obtida. Para tanto, o gene *glnZ* de *A. brasilense* foi clonado no vetor pET28a com a sequência que codifica para a cauda His tag deletada e, desta maneira, a proteína GlnZ expressa a partir desta construção não apresentará esta sequência. O gene *glnZ* de *A. brasilense* foi retirado do plasmídeo pMSA-L1, utilizando as enzimas *XbaI* e *BamHI*, e posteriormente clonado no vetor pET28a. Este plasmídeo foi denominado pMSA-4. (Figura 5).

#### 4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ-HIS DE *A. brasilense* EM *E. coli*

Os plasmídeos recombinantes capazes de superexpressar a proteína GlnZ de *A. brasilense* na sua forma nativa (pMSA-L1 e pMSA-4) ou na sua forma His-tag (pMSA-3) foram transformados nas estirpes de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e RB9065( $\lambda$ DE3). Estas linhagens expressam a RNA polimerase do fago T7 após indução com IPTG ou lactose, permitindo a síntese da proteína GlnZ ou GlnZ-His.

FIGURA 4 – ESQUEMA DA CLONAGEM DO GENE *glnZ* DE *A. brasilense* NO VETOR pET28a ORIGINANDO O PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-3

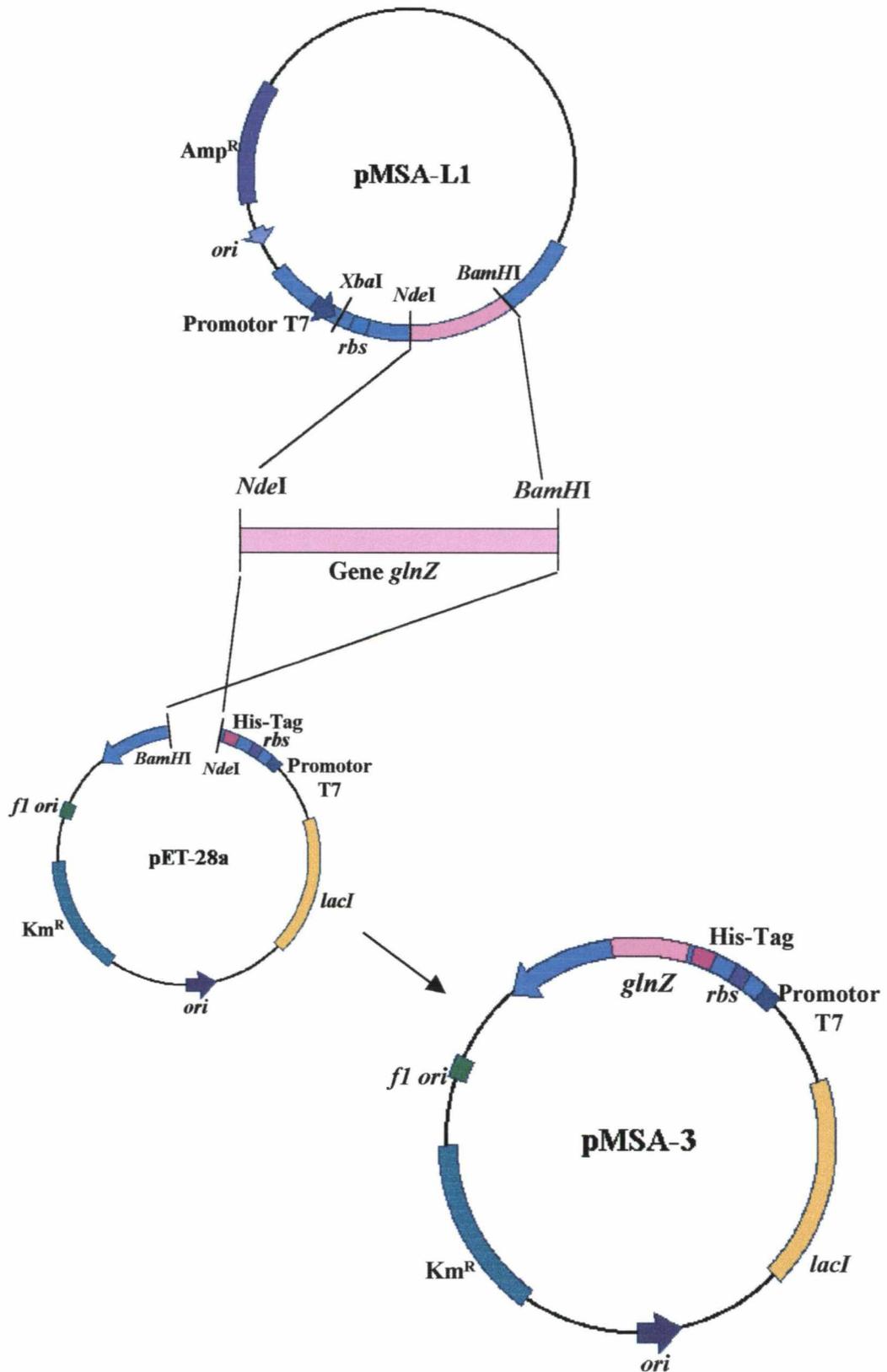
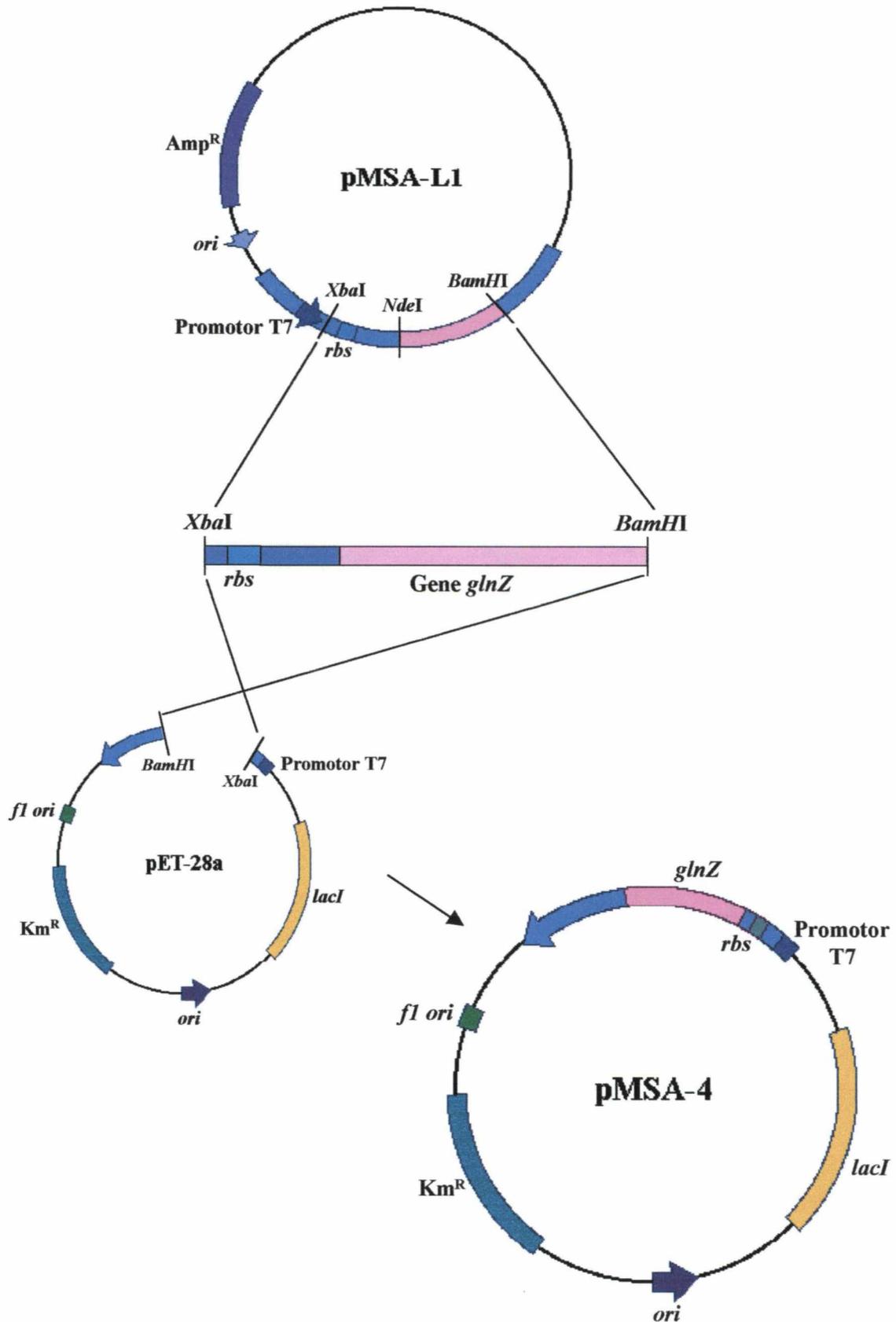


FIGURA 5 – ESQUEMA DA CLONAGEM DO GENE *glnZ* DE *A. brasilense* NO VETOR pET28a ORIGINANDO O PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-4



#### 4.2.1 Expressão da Proteína GlnZ Nativa de *A. brasilense* em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*

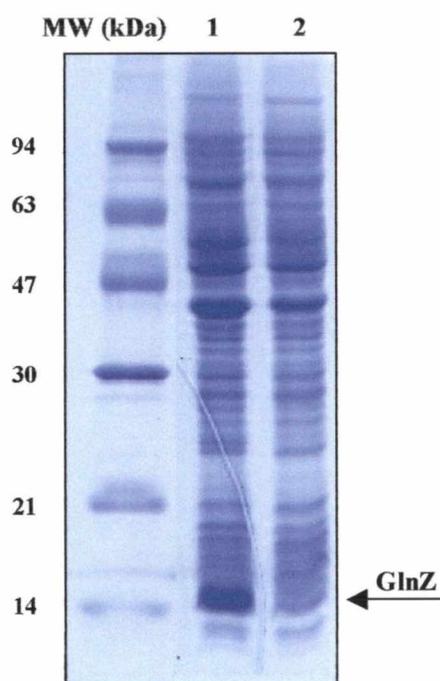
A proteína GlnZ de *A. brasilense* foi superexpressa na estirpe de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* conforme descrito em Material e Métodos e analisada por eletroforese desnaturante.

É possível observar que as células *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* contendo o plasmídeo recombinante pMSA-L1 expressam uma proteína que migra na região de 14 kDa (Figura 6). Esta banda apresenta taxa de migração próxima da esperada para a proteína GlnZ nativa de *A. brasilense* e não está presente na linha correspondente ao extrato protéico das células *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* contendo somente o vetor pT7-7. Este resultado indica que o plasmídeo pMSA-L1 está superexpressando a proteína GlnZ de *A. brasilense*.

A proteína GlnZ nativa também foi expressa a partir do plasmídeo pMSA-4. Na figura 7 observa-se uma banda protéica presente na linha correspondente ao extrato protéico das células BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o plasmídeo pMSA-4 que está ausente na linha controle. Esta banda apresenta migração na faixa de 14 kDa e corresponde à superexpressão da proteína GlnZ nativa de *Azospirillum brasilense*.

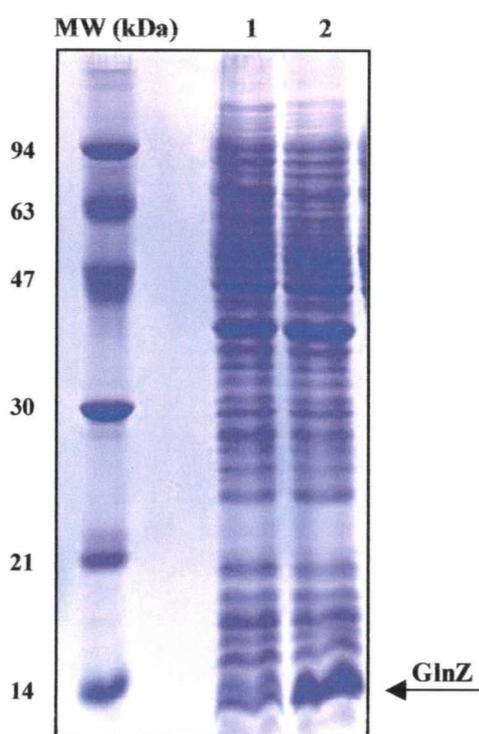
As figuras 6 e 7 mostram o perfil eletroforético das proteínas do extrato bruto de células superexpressando a proteína GlnZ nativa de *A. brasilense*. Esta proteína foi encontrada em concentração semelhante tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel dos extratos protéicos das células transformantes (dados não mostrados), e, apesar disso, a proteína GlnZ nativa foi expressa na fração solúvel em nível suficientemente elevado para permitir a sua purificação.

**FIGURA 6 – ELETROFORESE DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense* A PARTIR DO PLASMÍDEO pMSA-L1**



Perfil eletroforético em glicina SDS-PAGE 15% de proteínas do extrato celular de células *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o plasmídeo recombinante pMSA-L1 (linha 1) ou com o vetor de expressão pT7-7 (linha 2). As células foram induzidas com lactose conforme descrito em Material e Métodos. Cerca de 50  $\mu$ g de proteína foram aplicados em cada linha. Os marcadores de massa molecular (MW) estão indicados. A seta indica a proteína GlnZ nativa superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

FIGURA 7 – ELETROFORESE DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense* A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-4



Perfil eletroforético em glicina SDS-PAGE 15% das proteínas (cerca de 50  $\mu$ g) presentes nos extratos celulares de células *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o vetor pET28a (linha 1) ou com o plasmídeo recombinante pMSA-4 (linha 2) após indução com lactose conforme descrito em Material e Métodos. Os padrões de massa molecular estão indicados (MW). A seta indica a proteína GlnZ expressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

#### 4.2.2 Expressão da Proteína GlnZ Nativa de *A. brasilense* em *Escherichia coli* RB9065( $\lambda$ DE3)

A estirpe RB9065( $\lambda$ DE3) de *E. coli* (BENELLI et. al., 2001) (derivada da estirpe RB9065 (BUENO et. al., 1985)), é um mutante duplo *glnB* e *glnD* que possui o gene da RNA polimerase do fago T7. Considerando estas características genotípicas, a proteína GlnZ de *A. brasilense* superexpressa nesta estirpe está livre de ser uridililada pelo produto do gene *glnD*, a proteína GlnD, e não há possibilidade de formação de híbridos com a proteína GlnB endógena. Sendo assim, a indução da proteína GlnZ nesta estirpe bacteriana teve como objetivo a obtenção de altas quantidades de uma proteína GlnZ mais homogênea.

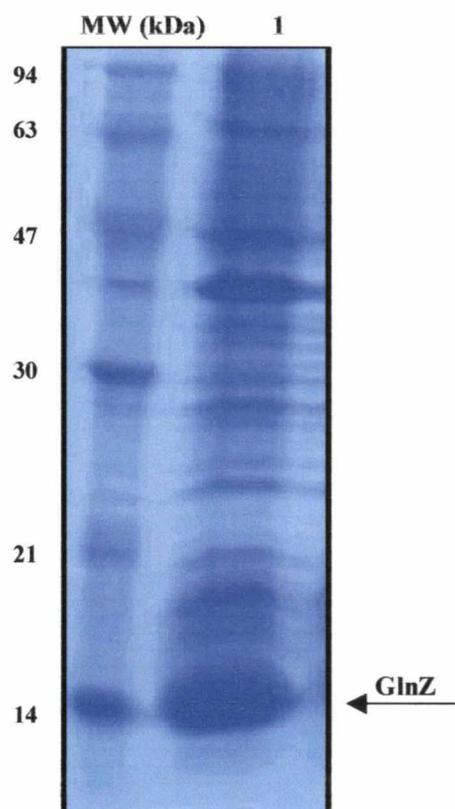
A proteína GlnZ em sua forma nativa foi superexpressa nesta estirpe de *E. coli*, a partir do plasmídeo pMSA-L1 e indução com IPTG 0,5 mmol/L. Como resultado pode-se observar a presença de uma banda de proteína correspondente à superexpressão da proteína GlnZ de *A. brasilense* na sua forma nativa (Figura 8). A lactose não promoveu um nível de expressão razoável nesta estirpe mutante de *E. coli* (dados não mostrados).

#### 4.2.3 Expressão da Proteína GlnZ-His de *A. brasilense* em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*

A proteína GlnZ de *A. brasilense* fusionada a cauda de histidinas apresentou uma boa taxa de indução nesta estirpe de *E. coli*. O plasmídeo recombinante pMSA-3 e o vetor pET28a foram transformados em células *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e induzidos com lactose. Em seguida, os extratos protéicos das células transformantes foram preparados e analisados em géis glicina SDS-PAGE 15%.

Na figura 9 observa-se uma banda, na região de 14kDa, na linha correspondente ao extrato protéico das células transformadas com o plasmídeo recombinante pMSA-3 que está ausente na linha controle (extrato protéico das células

FIGURA 8 – ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE *A. brasilense* A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-L1



Perfil eletroforético em gel glicina SDS-PAGE 15% dos extratos protéicos das células *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante pMSA-L1 (linha 1) e induzidas com IPTG 0,5 mmol/L por cerca de 4 horas a 37°C. O marcador de massa molecular está indicado (MW). A seta indica a proteína GlnZ nativa de *A. brasilense* expressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

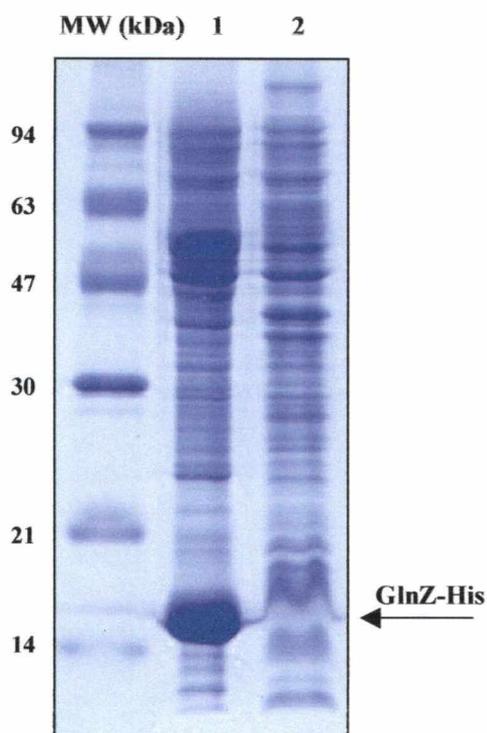
transformadas somente com o vetor pET28a). Esta banda, com a taxa de migração correspondente ao esperado para a proteína GlnZ de *A. brasilense* juntamente com a cauda de histidinas, corresponde a superexpressão desta proteína de interesse a partir do plasmídeo recombinante pMSA-3. O nível de expressão da proteína GlnZ-His nestas condições foi suficiente para permitir a sua purificação.

#### 4.2.4 Expressão da Proteína GlnZ-His de *A. brasilense* em *Escherichia coli* RB9065( $\lambda$ DE3)

A proteína GlnZ-His foi superexpressa a partir do plasmídeo pMSA-3 em células *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3). Na figura 10 observa-se a presença de uma banda de cerca de 14kDa na linha correspondente ao extrato protéico total das células transformadas com o plasmídeo pMSA-3 que indica a superexpressão da proteína GlnZ-His após indução com 0,5 mmol/L de IPTG. Esta banda está ausente na linha controle.

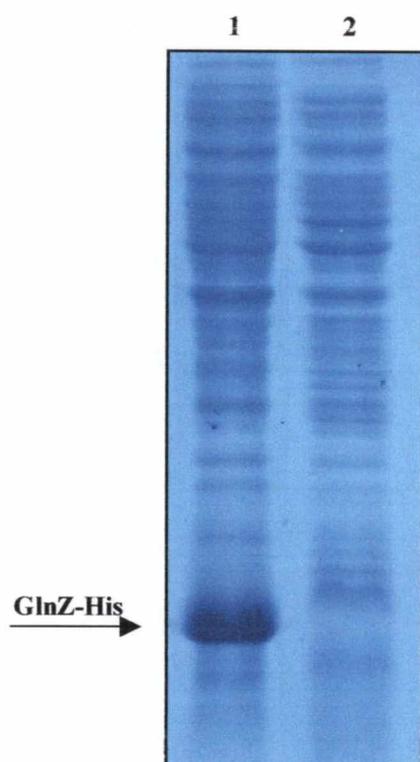
Considerando que as proteínas GlnZ e GlnZ-His foram superexpressas em quantidades adequadas, os protocolos de purificação puderam ser iniciados.

**FIGURA 9 – ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-3**



Eletoforese em gel glicina SDS-PAGE 15% mostrando o perfil protéico dos extratos celulares de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o vetor pET28a (linha 2) e com o plasmídeo recombinante pMSA-3 (linha 1) após indução com lactose conforme descrito em Material e Métodos. MW indica marcador de massa molecular. A seta indica a proteína GlnZ-His expressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

**FIGURA 10 – ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* A PARTIR DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pMSA-3**



Perfil eletroforético em gel glicina SDS-PAGE 15% dos extratos protéicos de células *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) transformadas com o plasmídeo pMSA-3 (linha 1) e com o vetor pET28a (linha 2). As células foram induzidas com IPTG conforme procedimento descrito em Material e Métodos. Cerca de 50  $\mu$ g de proteína foram aplicados em cada linha. A seta indica a proteína GlnZ-His superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

### 4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ-HIS DE *Azospirillum brasilense*

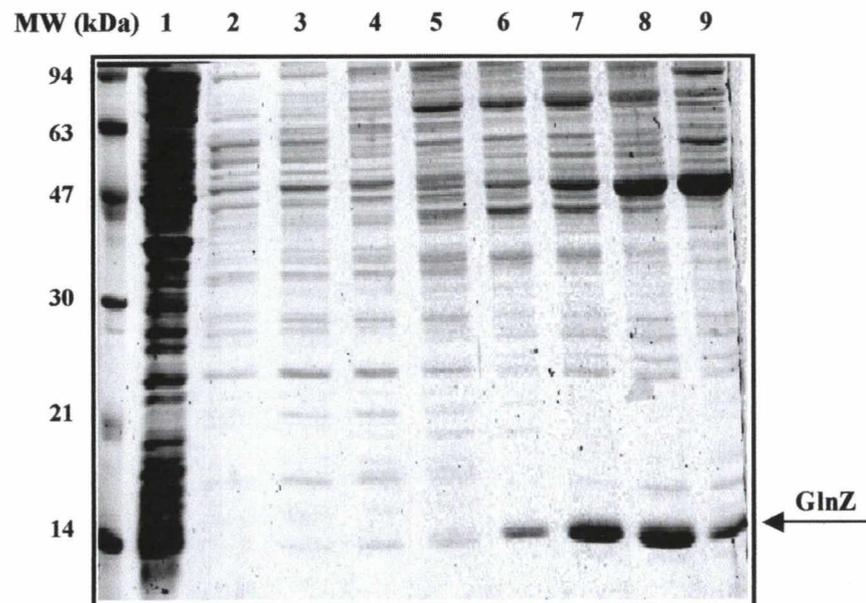
#### 4.3.1 Purificação da proteína GlnZ nativa de *A. brasilense*

A proteína GlnZ nativa de *A. brasilense* foi purificada a partir da expressão do plasmídeo pMSA-L1 (ARAUJO, 2000) transformado em células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*. Após a expressão da proteína, o protocolo de purificação da proteína GlnZ nativa pode ser iniciado. Este protocolo baseou-se inicialmente naquele descrito por BENELLI (1997) para a proteína GlnB de *H. seropedicae*, porém, ao longo do processo, sofreu algumas modificações para que a purificação fosse otimizada.

Células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* contendo o plasmídeo pMSA-L1 foram induzidas com 0,5% de lactose e processadas conforme o item 3.15 de Material e Métodos. O tratamento com sulfato de protamina eliminou o DNA e algumas proteínas contaminantes presentes na amostra (dados não apresentados). Esta fração protéica tratada foi então submetida a uma cromatografia de troca iônica utilizando a resina Q-Sepharose.

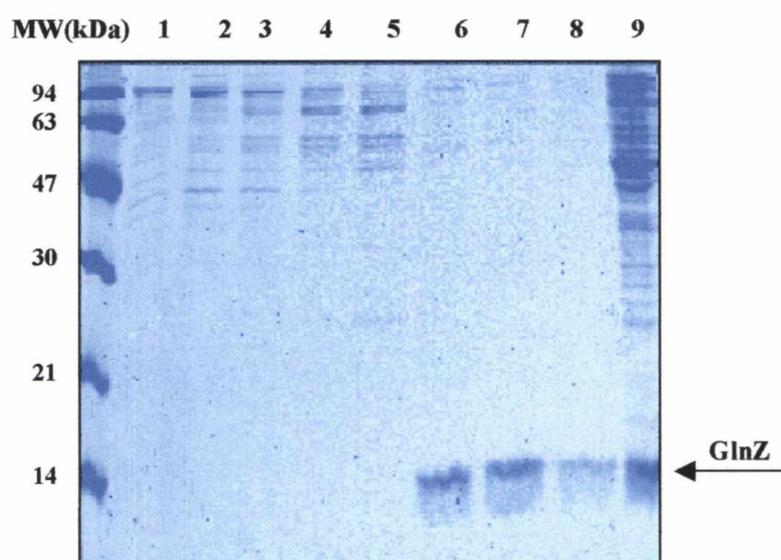
Nesta coluna, a proteína GlnZ nativa foi eluída em aproximadamente 600 mmol/L de KCl (Figura 11). Embora muitas proteínas contaminantes tenham sido eliminadas durante este passo cromatográfico, a proteína GlnZ ainda apresentou um número razoável de contaminantes. Com o objetivo de melhorar a pureza das frações coletadas da coluna Q-Sepharose, as amostras com maior concentração de proteína GlnZ foram agrupadas e aplicadas na coluna de afinidade HiTrap Heparin. Nesta coluna a proteína GlnZ foi eluída também em cerca de 600 mmol/L de KCl (Figura 12). As frações recuperadas foram analisadas em gel de glicina SDS-PAGE 15% e a análise densitométrica do gel, após coloração com prata, indicou uma pureza de 97% (Figura 13).

FIGURA 11 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE *A. brasilense* OBTIDAS DURANTE SUA PURIFICAÇÃO NA COLUNA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE



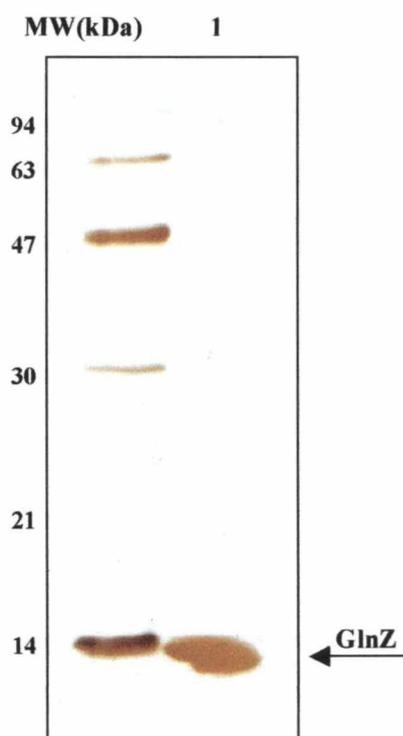
Perfil eletroforético de frações obtidas a partir de cromatografia na coluna de troca iônica Q-Sepharose do extrato protéico de células BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* expressando a proteína GlnZ nativa de *A. brasilense*. Linha 1: extrato protéico após tratamento com sulfato de protamina. Linhas 2 a 9: frações eluídas com aproximadamente 600 mmol/L de KCl. A seta indica a proteína GlnZ. Os marcadores de massa molecular estão indicados (MW). As amostras foram analisadas em gel glicina SDS-PAGE 15% e as proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

FIGURA 12 – PERFIL PROTEICO DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA HITRAP HEPARIN DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE *Azospirillum brasilense*



Frações contendo a proteína GlnZ eluída da coluna Q-Sepharose foram agrupadas (linha 9) e aplicadas na coluna de afinidade HiTrap Heparin. As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente de KCl (linhas 1 a 8). As linhas 6 a 8 mostram frações eluídas com cerca de 600 mmol/L de KCl. Os marcadores de massa molecular estão indicados (MW). As amostras foram analisadas em gel glicina SDS-PAGE 15% e as proteínas coradas com Coomassie Blue. A seta indica a proteína GlnZ.

FIGURA 13 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE UMA FRAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ NATIVA DE *Azospirillum brasilense* PURIFICADA



Eletroforese em gel glicina SDS-PAGE 15% com a proteína GlnZ de *A. brasilense* purificada e corada com prata (linha 1). Marcadores de massa molecular estão indicados (MW) assim como a proteína GlnZ (seta).

#### 4.3.2 Purificação da proteína GlnZ-His de *Azospirillum brasilense*

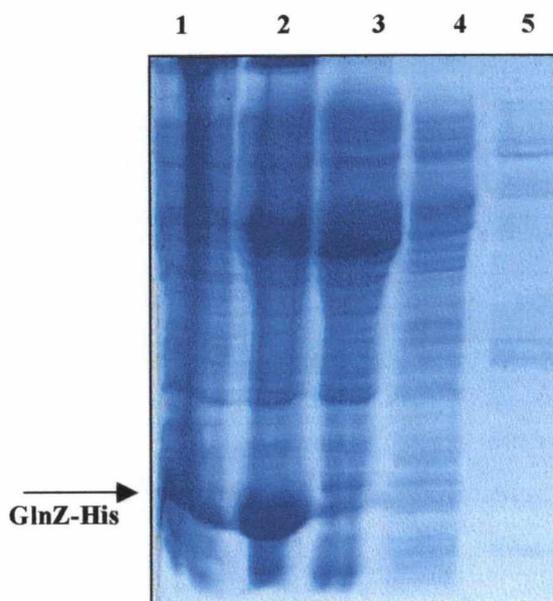
A proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense* também foi purificada na forma GlnZ-His. A presença da sequência His tag é importante uma vez que a purificação da proteína pode ser realizada em apenas um passo cromatográfico através uma resina que liga metais. Neste trabalho foi utilizada a resina Hi-Trap Chelating Ni<sup>+2</sup> (Amersham Biosciences).

*E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o plasmídeo pMSA-3 foram induzidas com lactose. O extrato protéico das células foi preparado e então aplicado na coluna de afinidade Hi-Trap Chelating Ni<sup>+2</sup> (Figura 14). As proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas com um gradiente de concentração de 10 a 500 mmol/L de imidazol, sendo que a proteína GlnZ-His foi eluída com a concentração de aproximadamente 300 mmol/L. Esse único passo cromatográfico permitiu obter um bom nível de purificação da proteína GlnZ-His, sendo que a melhor fração obtida apresentou 99% de pureza conforme análise densitométrica (Figura 15).

A maioria das frações da proteína GlnZ-His purificadas a partir da estirpe BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* de *E. coli* foram utilizadas para a produção de anticorpos policlonais contra esta proteína.

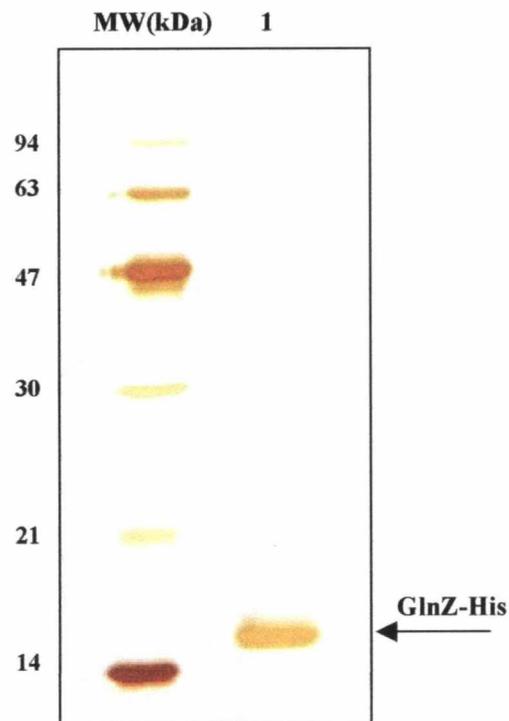
A proteína GlnZ-His também foi purificada a partir da sua expressão na estirpe RB9065( $\lambda$ DE3) de *E. coli* e purificação em coluna Hi-Trap Chelating Ni<sup>+2</sup> (Figura 16). Como é possível observar, a proteína foi eluída na faixa de concentração de 300 mmol/L de imidazol. Após análise densitométrica utilizando coloração com prata, verificou-se que as frações de proteína GlnZ-His apresentaram uma pureza de cerca de 99% (Figura 17).

FIGURA 14 – ELETROFORESE DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense*, NA COLUNA DE AFINIDADE HI-TRAP CHELATING-NI<sup>2+</sup>, A PARTIR DE CÉLULAS *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*



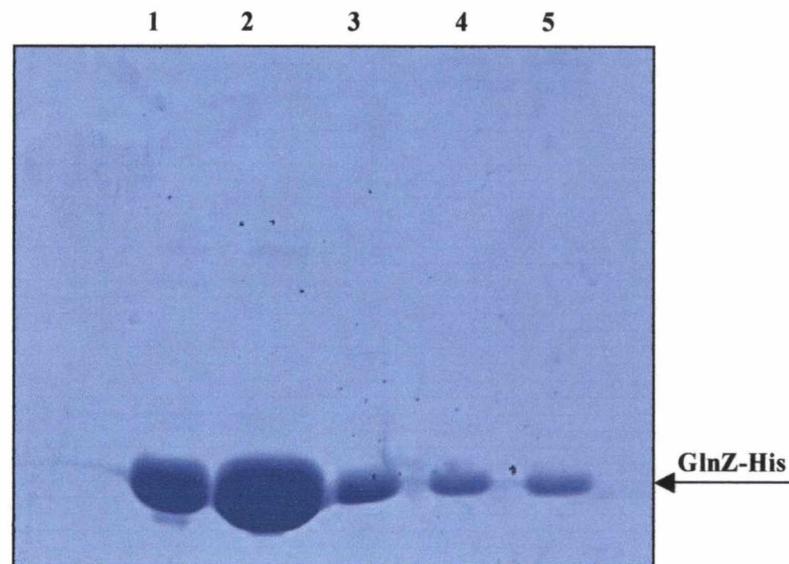
Perfil eletroforético em gel glicina SDS-PAGE 15% das amostras cromatografadas na coluna Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup>. Linha 1: fração da amostra do lisado das células BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o plasmídeo pMSA-3 e induzidas com lactose conforme descrito em Material e Métodos. Linha 2: fração do extrato bruto após tratamento com sulfato de protamina. Linhas 3, 4 e 5: amostras coletadas durante as lavagens da coluna antes de iniciar o gradiente de eluição com imidazol. A seta indica a proteína GlnZ-His. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

FIGURA 15 – ELETROFORESE DE UMA FRAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *Azospirillum brasilense* PURIFICADA NA COLUNA DE AFINIDADE HITRAP-CHELATING-NI<sup>2+</sup> A PARTIR DE CÉLULAS DE *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pLysS



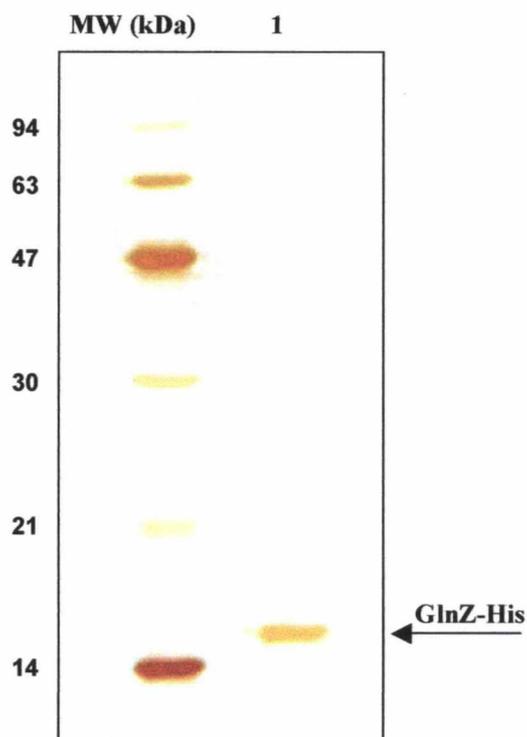
Eletroforese em gel glicina SDS-PAGE 15% com uma fração da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada e corada com prata (linha 1). Os marcadores de massa molecular (MW) estão indicados.

FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ELUÍDAS DA COLUNA HI-TRAP CHELATING  $\text{Ni}^{+2}$  DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* A PARTIR DA ESTIRPE RB9065( $\lambda$ .DE3)



Eletroforese em gel desnaturante glicina SDS-PAGE 15% com proteínas coradas com Coomassie Blue. Linhas 1 a 5: frações das amostras de proteína GlnZ-His eluídas com cerca de 300 mmol/L de imidazol. A seta indica a proteína GlnZ-His.

FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE UMA FRAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS PURIFICADA A PARTIR DE CÉLULAS RB9065( $\lambda$ DE3)



Eletroforese em gel desnaturante glicina SDS-PAGE 15% de uma fração da proteína GlnZ-His purificada (linha 1) a partir de células RB9065( $\lambda$ DE3) conforme descrito em Material e Métodos. MW indica os marcadores de massa molecular. As proteínas foram coradas com prata. A seta indica a proteína GlnZ-His.

#### 4.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *Escherichia coli*

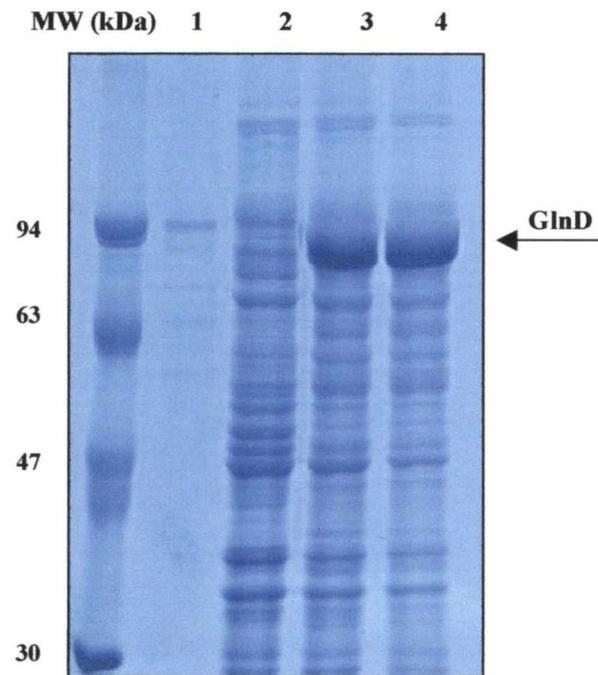
A proteína GlnD apresenta um papel fundamental no sistema Ntr que transmite informações sobre o nível de nitrogênio intracelular e é regulado por uma cascata transdutora de sinal.

de ZAMAROCZY et al. (1996) realizaram experimentos preliminares com a proteína GlnZ de *A. brasilense* e detectaram sua uridililação em condições limitantes de nitrogênio. Nenhum outro estudo mais aprofundado sobre a uridililação da proteína GlnZ de *A. brasilense* foi realizado. Para que o estudo da uridililação *in vitro* da proteína GlnZ pudesse ser realizado, optou-se por utilizar a proteína GlnD de *E. coli* para a modificação de GlnZ. Durante a realização deste trabalho, o gene *glnD* de *A. brasilense* ainda não estava disponível nos bancos de dados (van DOMMELEN et al., 2002).

O gene *glnD* de *E. coli* foi clonado no vetor pJLA503 dando origem ao plasmídeo recombinante pDOP1 (KAMBEROV et al., 1994). Este plasmídeo permite a expressão da proteína GlnD de *E. coli* sob o controle dos promotores P<sub>L</sub> e P<sub>R</sub> do fago Lamba. A superexpressão da proteína GlnD de *E. coli* é baseada em mudanças de temperatura e está descrita no item 3.17 de Material e Métodos.

Na figura 18 observa-se o resultado dos ensaios de superexpressão da proteína GlnD de *E. coli*. Nas linhas 3 e 4, correspondentes ao extrato protéico total das células DH10B transformadas com o plasmídeo pDOP1 após indução, têm-se a presença de uma banda que está ausente na linha 2 (controle). Esta proteína apresenta taxa de migração próxima à esperada para a proteína GlnD de *E. coli* em SDS-PAGE (cerca de 100 kDa). Na linha 1 observa-se uma fração da proteína GlnD de *E. coli* que foi parcialmente purificada por BENELLI (1997).

Considerando o bom nível de superexpressão da proteína GlnD de *E. coli*, seu protocolo de purificação foi iniciado.

FIGURA 18 – ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE *E. coli* EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnD

Perfil eletroforético em glicina SDS-PAGE 10% das proteínas do extrato celular de *E. coli* DH10B transformadas (linhas 3 e 4) ou não (linha 2) com o plasmídeo pDOP1. As células foram induzidas conforme descrito em Materiais e Métodos. Na linha 1 tem-se uma fração da proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada (BENELLI, 1997). Os marcadores de massa molecular estão indicados (MW). A seta indica a proteína GlnD superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

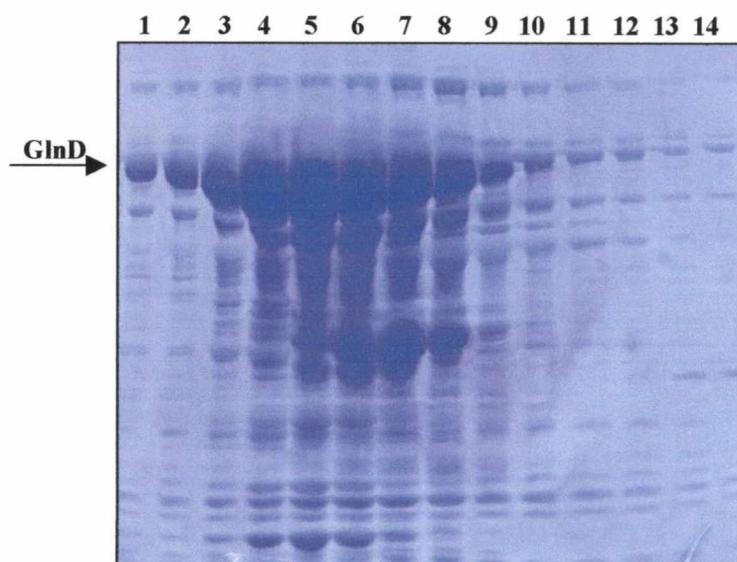
#### 4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *Escherichia coli*

O protocolo utilizado para a purificação da proteína GlnD de *E. coli* baseou-se naqueles descritos por KAMBEROV e colaboradores (1994) e por BENELLI (1997) e está descrito no item 3.18 de Material e Métodos.

Primeiramente, o extrato celular contendo a proteína GlnD de *E. coli* foi aplicado a uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. Nesta coluna, as proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente de KCl de 0,05 a 1 mol/L, sendo que a proteína GlnD foi eluída com cerca de 200 mmol/L de KCl (Figura 19). Embora algumas proteínas tenham sido eliminadas neste passo cromatográfico, o número de proteínas contaminantes nas amostras com maior concentração de proteína GlnD permaneceu bastante elevado.

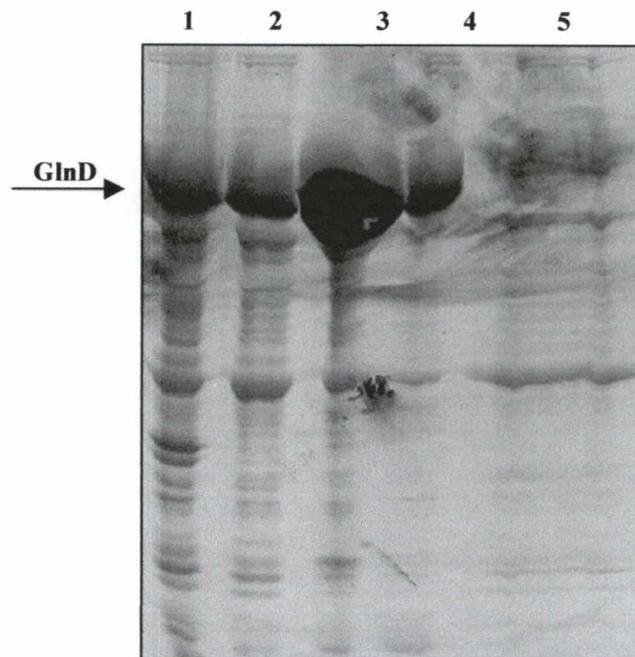
A fim de aumentar o grau de pureza da proteína, as alíquotas com alta concentração da proteína GlnD, eluídas da coluna DEAE-Sepharose, foram agrupadas e submetidas a uma precipitação com sulfato de amônio 35%. Esta estratégia (*salting out*), bastante eficiente, permitiu que a proteína GlnD precipitasse enquanto que a maioria das proteínas contaminantes da amostra permanecesse em solução (Figura 20). Ao final deste procedimento, a amostra precipitada foi dissolvida em uma solução e dialisada contra um tampão contendo 50 mmol/L de Tris HCl pH7,5, 0,1 mmol/L de DTT e 30% de glicerol permitindo a retirada do sulfato de amônio da amostra assim como sua concentração.

FIGURA 19 – PERFIL PROTEICO DAS AMOSTRAS ELUÍDAS NA COLUNA DEAE-SEPHAROSE DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli*



Eletroforese em gel glicina SDS-PAGE 10% das amostras eluídas da coluna DEAE-Sepharose com cerca de 200 mmol/L de KCl (linhas 1 a 14). As proteínas foram coradas com Coomassie Blue. A seta indica a proteína GlnD.

FIGURA 20 – PERFIL PROTÉICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DA PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli*



Eletroforese em gel glicina SDS-PAGE 10% com proteínas coradas com Coomassie Blue. Linha 1: fração do extrato protéico das células *E. coli* DH10B transformadas com o plasmídeo pDOP1 e induzidas conforme descrito em Material e Métodos. Linha 2: fração da amostra de proteínas aplicada na coluna DEAE-Sepharose após tratamento com sulfato de estreptomicina. Linha 3: fração da amostra precipitada com 35% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Linha 4: fração da amostra precipitada com 35 a 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Linha 5: fração do material que permaneceu solúvel após adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40%. A seta indica a proteína GlnD de *E. coli*.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense*

As proteínas da família P<sub>II</sub> desempenham um papel importante no controle do metabolismo de nitrogênio em diversas bactérias. A característica principal destas proteínas é a habilidade de interconversão entre duas formas resultantes de uma modificação covalente. Esta modificação é a uridililação das proteínas P<sub>II</sub> no seu resíduo de tirosina 51, bastante conservado nesta família de proteínas. A uridililação das proteínas P<sub>II</sub> já foi descrita em diversos organismos, como em *E. coli* (SON e RHEE, 1987), *Klebsiela pneumoniae* (MERRICK e EDWARDS, 1995) e *Herbaspirillum seropedicae* (BENELLI et al., 2001). A introdução e retirada do grupo UMP das proteínas do tipo P<sub>II</sub> depende da ação da proteína GlnD.

Assim como sua paróloga GlnB, a proteína GlnK de *E. coli* é prontamente uridililada pela proteína GlnD, porém, com algumas diferenças com relação ao estímulo ou inibição de moléculas efetoras (ATKINSON e NINFA, 1999).

Com a proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense* purificada, ensaios *in vitro* foram realizados a fim de verificar o seu comportamento diante do processo de uridililação.

##### 4.6.1 Uridililação *in vitro* da proteína GlnZ de *A. brasilense* utilizando [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-UTP

de ZAMAROCZY e colaboradores (1996) observaram que a proteína GlnZ de *A. brasilense* era modificada covalentemente *in vivo*. Entretanto, em nenhum trabalho a modificação *in vitro* da proteína GlnZ de *A. brasilense* foi reportada.

Os primeiros ensaios de uridililação da proteína GlnZ nativa de *A. brasilense* foram realizados utilizando UTP marcado radioativamente ([ $\alpha$ <sup>32</sup>P]). Para estes experimentos foram utilizadas GlnD de *A. brasilense*, presente em extratos de células crescidos na presença ou em limitação de amônia, ou a proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada. O resultado obtido está apresentado na Figura 21. Nas linhas

1 e 2 observa-se que a proteína GlnZ foi uridililada de forma semelhante pelo extrato livre de células de *A. brasilense* crescido tanto na presença quanto ausência de nitrogênio. Este resultado sugere que a proteína GlnD de *A. brasilense* tenha sua expressão constitutiva, não sendo regulada por íons amônio. Estudos recentes realizados por van DOMMELEN et al. (2002), que caracterizaram o gene *glnD* de *A. brasilense*, indicaram que a expressão de *glnD* é constitutiva, o que foi agora confirmado.

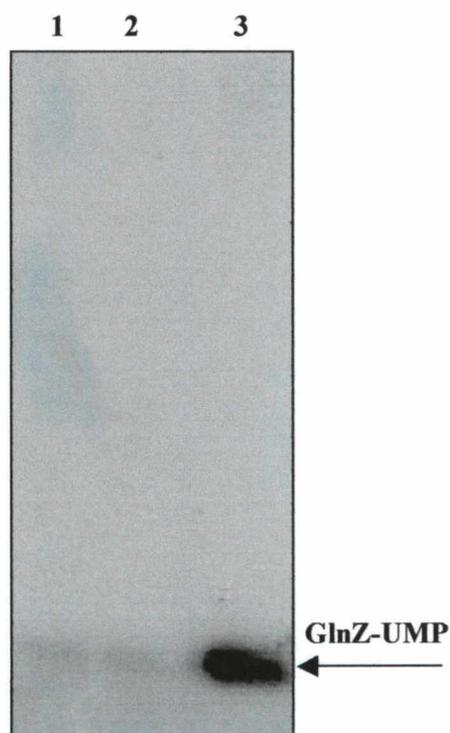
A proteína GlnZ foi também uridililada pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada, como pode ser observado na linha 3 da Figura 21. A taxa de uridililação, neste caso, foi mais intensa que aquela correspondente aos extratos celulares de *A. brasilense* utilizados como fonte da proteína GlnD. Este resultado deve-se, provavelmente, a maior quantidade de GlnD purificada presente na amostra 3 se comparada a aquela presente no extrato celular de *A. brasilense*.

#### 4.6.2 Uridililação *in vitro* da proteína GlnZ-His de *Azospirillum brasilense* e Análise através de eletroforese de poliacrilamida não desnaturante

As proteínas P<sub>II</sub> apresentam-se, na forma nativa, organizadas em homotrímeros. Em *E. coli*, estudos com as proteínas GlnB e GlnK mostraram que cada uma das subunidades protéicas pode ser modificada covalentemente pelo grupamento UMP (SON e RHEE, 1987).

A proteína do tipo P<sub>II</sub> uridililada apresenta taxa de migração eletroforética diferente da forma não modificada (quando analisada em gel de poliacrilamida não desnaturante). Devido à presença do grupo UMP a proteína apresenta taxa de migração maior quando comparada com a proteína não modificada. Isso permite que a uridililação das proteínas tipo P<sub>II</sub> possa ser visualizada sem a utilização de marcador radioativo ([ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP). Esta metodologia apresenta uma grande vantagem uma vez que elimina os riscos de manipulação de material radioativo, assim como a dependência de datas para a realização dos experimentos.

FIGURA 21 – AUTORADIOGRAFIA DO ENSAIO DE URIDILILAÇÃO *in vitro* DA PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense* PELO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS DE *Azospirillum brasilense* E PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli* PARCIALMENTE PURIFICADA



Auto-radiografia da uridililação da proteína GlnZ de *A. brasilense* pelo extrato livre de células de *A. brasilense* crescido na presença (linha 1) ou ausência (linha 2) de 20 mmol/L de amônio ou pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada (linha 3). As reações de uridililação foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.20) na presença de [ $\alpha^{32}$ -P]-UTP. A seta indica o sinal correspondente à proteína GlnZ-UMP.

Desta maneira, considerando a proteína GlnZ como um homotrímero, espera-se encontrar quatro possíveis bandas de proteínas correspondentes aos quatro possíveis estados da proteína tipo P<sub>II</sub>:

- um trímero totalmente não uridililado, ou seja, sem nenhuma molécula de UMP ligada,
- e trimeros contendo uma, duas ou as suas três subunidades modificadas.

#### 4.6.2.1 Efeito de diferentes fatores na uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*

Em *E. coli*, o papel da proteína GlnB é determinado através de pequenas moléculas sinalizadoras dos níveis celulares de nitrogênio e carbono (NINFA e ATKINSON, 2000). A glutamina, sinalizadora dos altos níveis de nitrogênio, é “sentida” pela proteína GlnD que então desuridilila a proteína GlnB através de sua atividade de enzima removedora de uridilil. Esta mesma enzima, através de sua atividade de uridililtransferase, vai uridililar a proteína GlnB quando os níveis de glutamina são baixos, ou seja, em condições de fixação de nitrogênio. Uma vez uridililada, a proteína GlnB é capaz de ativar o sistema Ntr através de NtrB (KAMBEROV et al., 1995). Em *Herbaspirillum seropedicae* a glutamina também é um inibidor da uridililação da proteína GlnB (BENELLI et al., 2001).

KAMBEROV e colaboradores (1995) reportaram que a uridililação da proteína GlnB de *E. coli* é ativada por 2-cetoglutarato e ATP, moléculas estas que se ligam com grande afinidade a GlnB e são indispensáveis para a atividade de GlnD (KAMBEROV et al., 1994). A uridililação da proteína GlnB de *H. seropedicae* é também estimulada por ATP e 2-cetoglutarato, porém, estes cofatores não foram considerados indispensáveis para esta atividade (BENELLI et al., 2001).

Levando em consideração a importância das moléculas sinalizadoras na uridililação de várias proteínas da família P<sub>II</sub>, ensaios de uridililação com a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* foram realizados a fim de identificar a necessidade destes

moduladores no seu processo de uridililação. Os resultados destes experimentos, realizados com a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada a partir da estirpe BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*, estão apresentados na Figura 22.

Semelhante ao apresentado na Figura 21, a proteína GlnZ-His foi uridililada pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada. Neste caso porém, a visualização desta modificação foi feita sem a utilização de UTP marcado. A modificação de GlnZ-His pode ser visualizada através da sua mudança de migração em gel não desnaturante. Neste experimento, a proteína GlnZ-His parece não ter sido totalmente modificada, já que apenas uma banda, abaixo daquela correspondente à proteína GlnZ-His não modificada (linha 1), foi observada. Esta banda provavelmente corresponde à proteína GlnZ-His – (UMP)<sub>1</sub>.

Com relação aos moduladores testados, os resultados indicam que a uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*, assim como a proteína GlnB de *E. coli* (KAMBEROV *et al.*, 1995), ocorre somente na presença de ATP e 2-cetoglutarato. Estes resultados sugerem que estes moduladores possam se ligar à proteína GlnZ-His assim como ocorre com as proteínas da família P<sub>II</sub> em *E. coli*, *H. seropedicae* e *Synechococcus* sp. permitindo que a uridililação ocorra (KAMBEROV *et al.*, 1995; XU *et al.*, 1998; BENELLI *et al.*, 2001; FORCHHAMMER e HEDLER, 1997).

Resultados similares foram obtidos através da análise do perfil de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada a partir da estirpe RB9065( $\lambda$ DE3) de *E. coli* frente aos diferentes moduladores ATP e 2-cetoglutarato. Estes resultados estão mostrados na Figura 23.

Comparando os resultados obtidos com relação ao processo de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada a partir das duas estirpes de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e RB9065( $\lambda$ DE3), pode-se concluir que não há diferença entre os padrões de migração da proteína GlnZ-His nos dois experimentos realizados. O principal objetivo da purificação da proteína GlnZ de *A. brasilense* na estirpe mutante RB9065( $\lambda$ DE3) era que esta proteína estivesse totalmente livre de possíveis

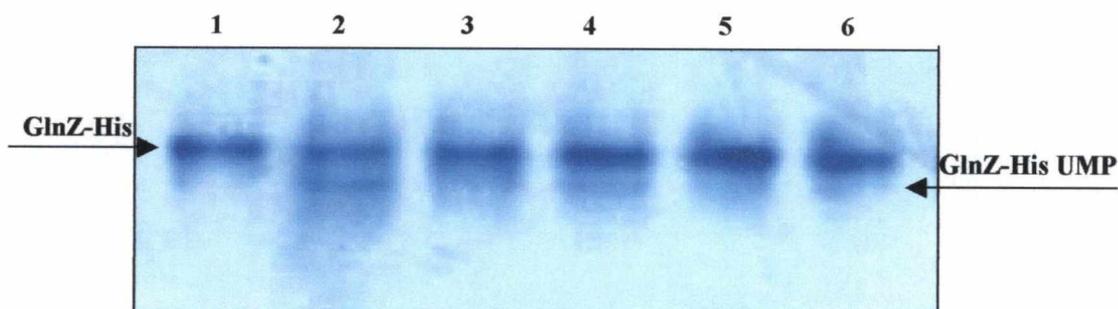
grupamentos UMP ou de estar ligada com outras proteínas homólogas a ela. Porém, o que foi observado é que, aparentemente, a proteína GlnZ-His purificada a partir da estirpe BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* encontra-se homogênea, pelo menos para este tipo de ensaio, uma vez que seu perfil de migração não é distinto daquele apresentado pela proteína GlnZ-His purificada da estirpe mutante.

Com relação às duas metodologias utilizadas em géis de poliacrilamida não desnaturantes baseados nos procedimentos de LAEMMLI (1970) ou FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC (1994), observa-se também uma equivalência no que diz respeito aos resultados obtidos. Ambos procedimentos mostraram-se eficientes com relação às análises de mudança de conformação da proteína GlnZ-His, porém, os dois também apresentaram dificuldades durante as etapas de preparo dos géis (dificuldades de polimerização) e corrida eletroforética (instabilidade do tempo de corrida).

#### 4.6.2.2 Efeito da concentração da proteína GlnD de *E. coli* sobre a uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*

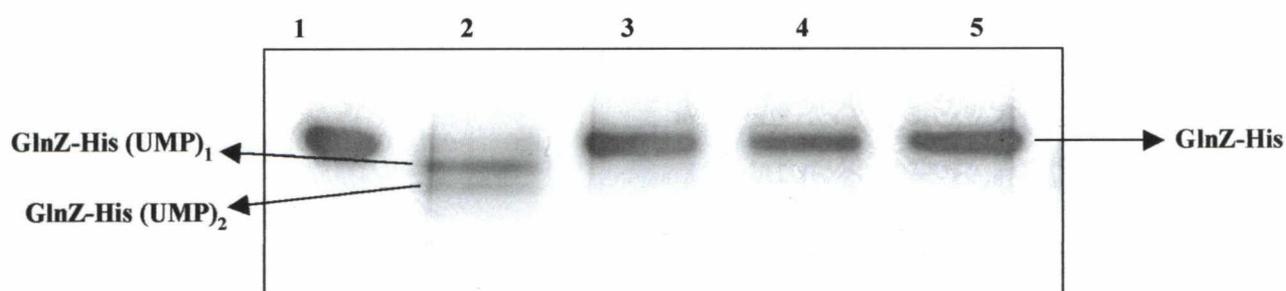
Para investigar o efeito da concentração da proteína GlnD de *E. coli* na uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*, sistemas de uridililação da proteína GlnZ-His foram realizados na presença de diferentes concentrações de proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada e analisados em eletroforese de poliacrilamida em gel não desnaturante (Material e Métodos, item 3.13, baseado em LAEMMLI, 1970).

FIGURA 22 – PERFIL DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli* PARCIALMENTE PURIFICADA FRENTA A DIFERENTES FATORES (ATP E 2-CETOGLUTARATO)



Eletoforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 10% (sistema LAEMMLI (1970) na ausência de SDS) realizado conforme descrito em Material e Métodos. Linha 1: linha controle mostrando uma fração da proteína GlnZ-His purificada a partir da estirpe BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* (0,1 mg/mL). Linha 2: fração do sistema de uridililação completo contendo 0,1 mg/mL de GlnZ-His, 0,1 mmol/L de ATP, 10 mmol/L de 2-cetoglutarato, 1 mmol/L de UTP e 0,5  $\mu$ mol/L de GlnD. Linha 3: fração do sistema de uridililação realizado na ausência de UTP. Linha 4: amostra do sistema de uridililação realizado na ausência de ATP. Linha 5: fração do sistema de uridililação realizado sem a presença de ATP e 2-cetoglutarato. Linha 6: uma fração do sistema realizado na ausência de 2-cetoglutarato. As setas indicam a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* não modificada e na sua forma uridililada. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

FIGURA 23 – EFEITO DO ATP E 2-CETOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* EM ELETROFORESE NATIVA PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli*



Eletroforese de poliacrilamida não desnaturante 7,5% (FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC, 1994) realizada conforme descrito em Material e Métodos. Linha 1: fração da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*, purificada a partir da estirpe RB9065( $\lambda$ DE3), não modificada (3  $\mu$ mol/L). Linha 2: fração do sistema de uridililação completo da proteína GlnZ-His na presença de 0,1 mmol/L de ATP, 10 mmol/L de 2-cetoglutarato, 1 mmol/L de UTP e 0,6  $\mu$ mol/L de GlnD. Linha 3: sistema de uridililação sem a presença de ATP. Linha 4: sistema de uridililação sem a presença de 2-cetoglutarato. Linha 5: sistema de uridililação da proteína GlnZ-His sem a presença de ATP e 2-cetoglutarato. As setas indicam a proteína GlnZ-His não modificada e na sua forma GlnZ-UMP. As proteínas foram coradas com prata.

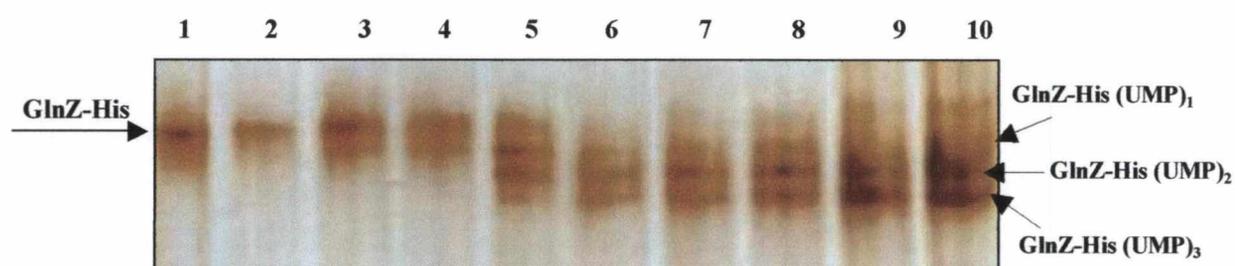
As concentrações da proteína GlnD de *E. coli* variaram de 0,005 a 0,5  $\mu\text{mol/L}$  nos ensaios realizados e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 24. A proteína GlnZ-His aparentemente começou a ser uridililada na concentração de 0,0075  $\mu\text{mol/L}$  de proteína GlnD (linha 3) onde é possível a visualização de uma banda abaixo daquela correspondente à proteína GlnZ-His não modificada (linha 1). Na medida em que a concentração de proteína GlnD foi aumentando, a taxa de uridililação da proteína GlnZ-His acompanhou esta elevação e, a partir da concentração de 0,025  $\mu\text{mol/L}$  (linha 5), é possível observar as quatro bandas correspondentes aos diferentes graus de uridililação da proteína GlnZ-His. Com o aumento da concentração de GlnD, a proporção de proteínas com dois ou três grupamentos UMP aumenta, atingindo aparentemente a saturação com 0,25  $\mu\text{mol/L}$ . Em nenhuma condição foi observada a proteína GlnZ-His totalmente uridililada.

A análise densitométrica das proteínas do ensaio apresentado na Figura 24 indicou que com 0,05  $\mu\text{mol/L}$  de GlnD no ensaio já não era possível detectar a proteína GlnZ-His não modificada (Figura 25). Esta concentração corresponde, pela visualização da Figura 24 (linha 6), àquela onde a proteína GlnZ-His pode ser observada, preferencialmente, nos seus 3 estados conformacionais modificados.

#### 4.6.3 Uridililação *in vitro* da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* e Análise em gel de poliacrilamida desnaturante Tricina SDS-PAGE

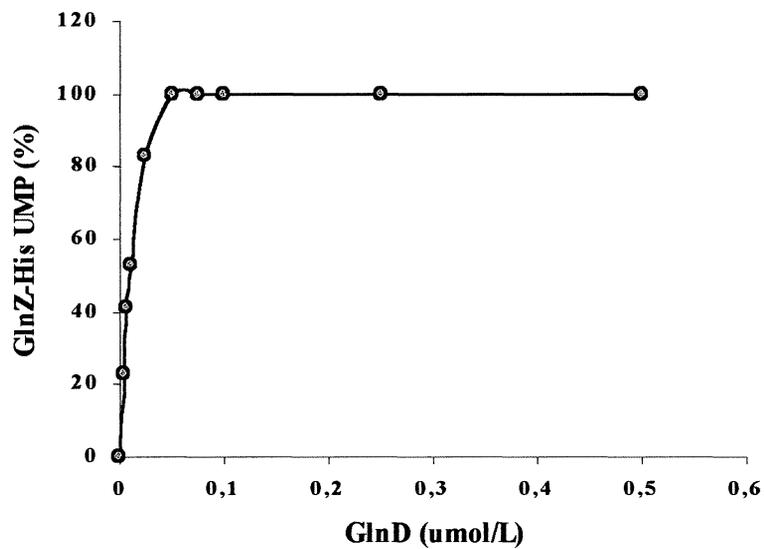
O processo de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* também foi analisado através de eletroforeses em géis de poliacrilamida desnaturantes segundo o protocolo descrito por SCHAGGER e VON JAGOW (1987) com pequenas modificações (Material e Métodos, item 3.12.2). Esta metodologia baseia-se em um sistema de SDS-PAGE descontínuo para a separação de proteínas com massa molecular na faixa de 1 a 100 kDa.

FIGURA 24 – PERFIL DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *Azospirillum brasilense* FRENTE A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli* PARCIALMENTE PURIFICADA



Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 10% (sistema LAEMMLI (1970) na ausência de SDS) realizada conforme procedimento descrito em Material e Métodos. Esta figura mostra o perfil de uridililação da proteína GlnZ-His (0,1 mg/mL) (linha 1) em sistemas de uridililação (linhas 2 a 10) contendo ATP 0,1 mmol/L, 2-cetoglutarato 10 mmol/L e UTP 1 mmol/L com concentrações crescentes da proteína GlnD: 0,005  $\mu\text{mol/L}$  (linha 2), 0,0075  $\mu\text{mol/L}$  (linha 3), 0,01  $\mu\text{mol/L}$  (linha 4), 0,025  $\mu\text{mol/L}$  (linha 5), 0,05  $\mu\text{mol/L}$  (linha 6), 0,075  $\mu\text{mol/L}$  (linha 7), 0,1  $\mu\text{mol/L}$  (linha 8), 0,25  $\mu\text{mol/L}$  (linha 9) e 0,5  $\mu\text{mol/L}$  (linha 10). Os sistemas foram incubados por 30 minutos a 30°C. As setas indicam a proteína GlnZ-His sem estar modificada e também os diferentes graus de sua uridililação. As proteínas foram coradas com prata.

FIGURA 25 – ANÁLISE QUANTITATIVA DA PORCENTAGEM DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS de *A. brasilense* FRENTE A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE PROTEÍNA GlnD DE *E. coli* PARCIALMENTE PURIFICADA



Análise da porcentagem da proteína GlnZ-His modificada realizada através da densitometria do gel de poliacrilamida não desnaturante apresentado na Figura 24, que mostra o perfil eletroforético de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* frente a concentrações crescentes da proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada. As concentrações de enzima GlnD de *E. coli* estão indicadas. Neste gráfico, a porcentagem de uridililação da proteína GlnZ-His corresponde ao desaparecimento da forma não modificada da proteína no gel de poliacrilamida não desnaturante.

A tricina, o íon carreador no processo de separação protéica, permite a resolução de pequenas proteínas em concentrações mais baixas de acrilamida que aquelas utilizadas em sistemas de glicina SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Através desta metodologia, uma melhor resolução de proteínas na faixa entre 5 e 20 kDa pode ser obtida.

Através de sua uridililação, a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* tem sua massa molecular aumentada em cerca de 250 Da (tamanho aproximado do grupamento UMP). Desta forma, um sistema de uridililação da proteína GlnZ-His, após sua incubação na presença da proteína GlnD, aplicado em um gel Tricina SDS-PAGE, apresentaria duas formas distintas da proteína GlnZ-His: o monômero GlnZ-His livre (sem ter sido uridililado) e o monômero GlnZ-His uridililado. Este último, por ter em sua estrutura o grupamento UMP, tende a migrar mais lentamente que a proteína GlnZ-His livre.

Diferente das eletroforeses de poliácridamida não desnaturantes já utilizadas para a análise da uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* neste trabalho, o sistema de Tricina SDS-PAGE mostrou-se mais eficiente em termos de preparo dos géis e corrida eletroforética.

Nos experimentos seguintes, a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* utilizada foi aquela purificada a partir da estirpe mutante RB9065( $\lambda$ DE3) de *E. coli*.

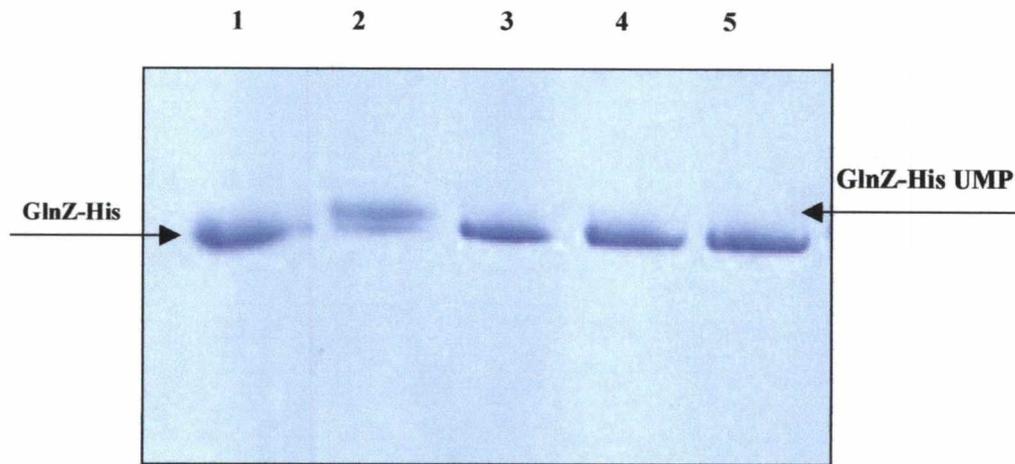
Para iniciar esta nova metodologia, alguns ensaios com a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* (com resultados anteriormente confirmados) foram realizados a fim de se comprovar a eficiência do protocolo. Primeiramente, a uridililação da proteína GlnZ-His foi novamente testada com relação à sua dependência dos moduladores ATP e 2-cetoglutarato. O resultado deste experimento está apresentado na Figura 26. Como é possível observar, quando o sistema de uridililação está completo, duas bandas são visíveis (linha 2), indicando que esta metodologia de eletroforese permite a separação entre a forma GlnZ-His e GlnZ-His UMP. A banda superior corresponde à proteína GlnZ-His uridililada e a banda inferior, com menor massa molecular, corresponde à proteína GlnZ-His não modificada. Corroborando os indicativos anteriores, o resultado

obtido através deste experimento também mostra que a uridililação da proteína GlnZ-His é mesmo totalmente dependente dos moduladores ATP e 2-cetoglutarato assim como a proteína GlnB de *E. coli* (KAMBEROV et al., 1995).

Uma curva de concentração da enzima GlnD de *E. coli* parcialmente purificada também foi realizada e analisada através desta metodologia. As condições dos sistemas de uridililação da proteína GlnZ-His foram as mesmas utilizadas durante a realização do experimento anterior (item 4.6.2.2) assim como as concentrações de proteína GlnD utilizadas, de 0,005 a 0,5  $\mu\text{mol/L}$ . Diferente do observado no ensaio anteriormente descrito (Figura 24 do item 4.6.2.2), analisado em eletroforese nativa, a proteína GlnZ-His foi uridililada apenas na presença das concentrações mais elevadas de proteína GlnD (0,1; 0,25 e 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) (dados não mostrados). Estes resultados foram observados provavelmente devido à necessidade de uma maior quantidade de monômeros da proteína GlnZ-His uridililada, uma vez que esta metodologia está baseada em géis de poliacrilamida desnaturantes.

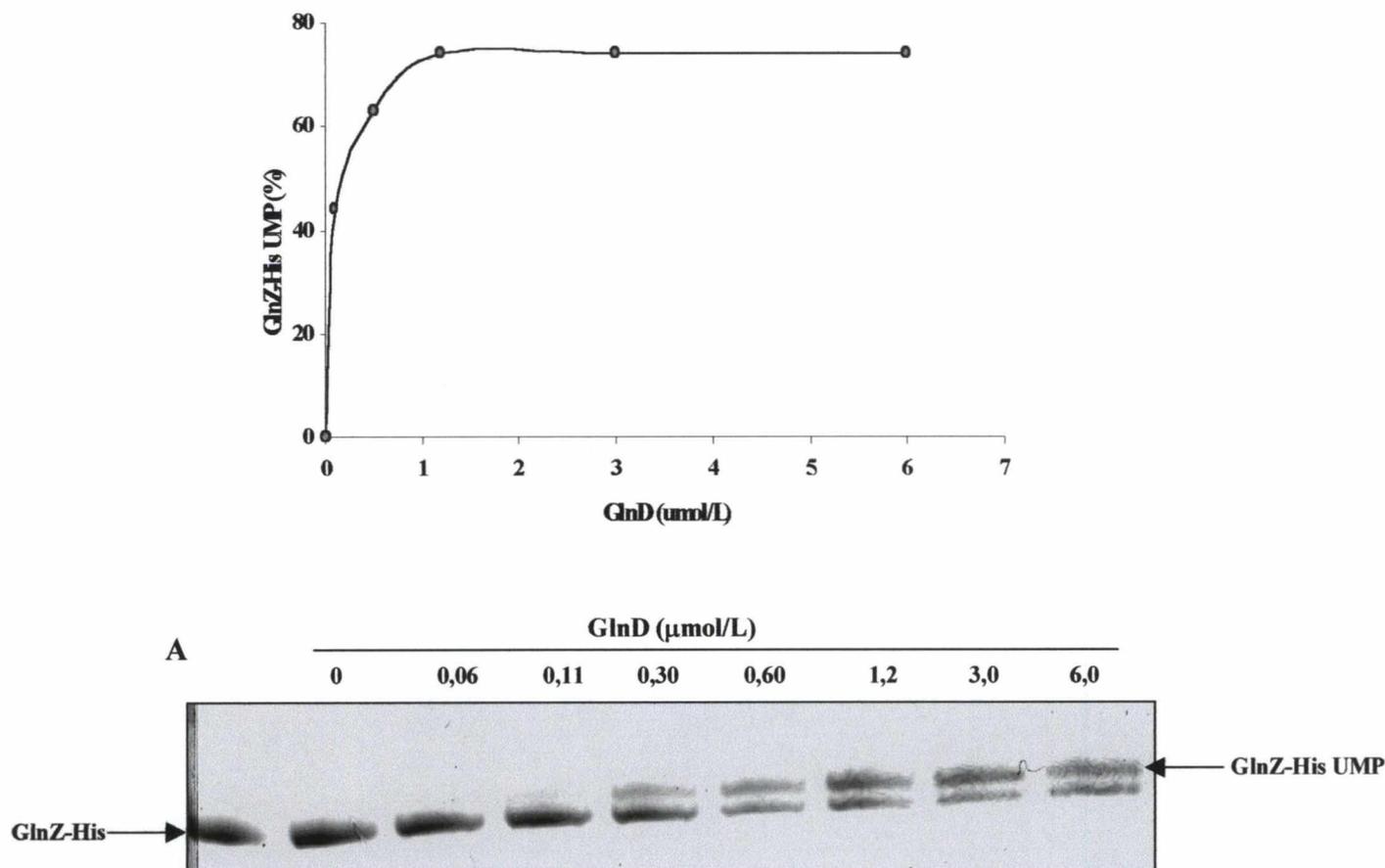
Com o objetivo de continuar a realizar os experimentos de caracterização do processo de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* através das eletroforeses de Tricina SDS-PAGE, fez-se necessária a realização de uma outra curva de proteína GlnD para que sua concentração ótima nos ensaios posteriores fosse determinada. Sendo assim, sistemas de reação de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*, contendo 0,1 mmol/L de ATP e 10 mmol/L de 2-cetoglutarato, foram analisados frente a concentrações crescentes da proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada. A melhor concentração de proteína GlnD foi determinada utilizando as concentrações de 0 a 6,0  $\mu\text{mol/L}$ . O resultado obtido está representado na Figura 27 e indica que a velocidade de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* aumentou rapidamente até a concentração de 1,2  $\mu\text{mol/L}$  de GlnD, a partir da qual tornou-se aparentemente constante. Sendo assim, a concentração ótima de proteína GlnD foi a de 0,3  $\mu\text{mol/L}$ , valor médio correspondente à porção ascendente da curva, que indica a concentração de enzima que representa sua atividade na velocidade inicial.

FIGURA 26 – URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli* NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE DIFERENTES MODULADORES E ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA TRICINA SDS-PAGE



Gel de poliacrilamida desnaturante de Tricina SDS-PAGE 25% com proteínas coradas com Coomassie Blue. Linha 1: fração da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada (3  $\mu\text{mol/L}$ ). Linha 2: reação de uridililação completa contendo 1 mmol/L de UTP, 0,1 mmol/L de ATP, 10 mmol/L de 2-cetoglutarato, 0,6  $\mu\text{mol/L}$  de GlnD e 3  $\mu\text{mol/L}$  de GlnZ-His. Linha 3: reação de uridililação sem a presença de ATP. Linha 4: reação de uridililação sem 2-cetoglutarato e a linha 5 corresponde à reação de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* sem a presença de ambos os moduladores ATP e 2-cetoglutarato. As setas indicam a proteína GlnZ-His não modificada e uridililada.

FIGURA 27 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA *GlnD* DE *E. coli* NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *Azospirillum brasilense*



A porcentagem de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* foi determinada pela densitometria dos géis desnaturantes de Tricina SDS-PAGE correspondentes aos experimentos realizados que analisaram a influência da concentração da enzima GlnD no processo de uridililação da proteína GlnZ-His (conforme descrito no item 4.6.3.). As concentrações de enzima GlnD utilizadas para a análise gráfica estão indicadas. Este gráfico mostra resultados representativos dos experimentos realizados.

No quadro A está representado um gel Tricina SDS-PAGE realizado nas condições experimentais descritas.

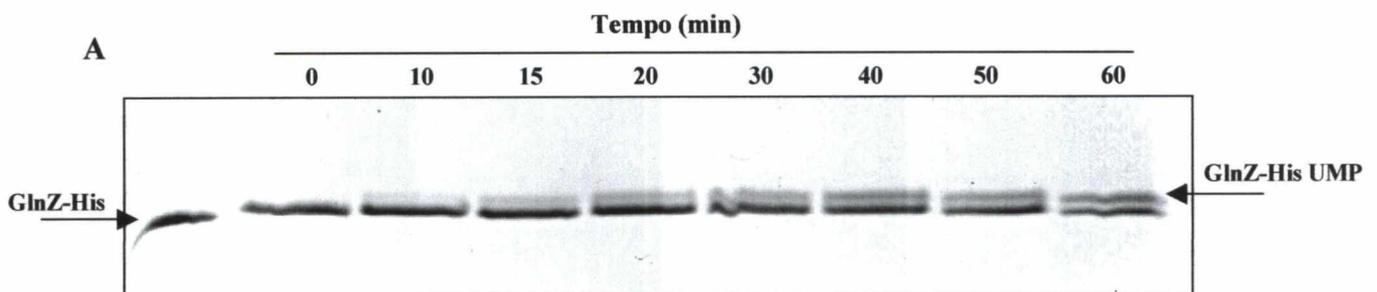
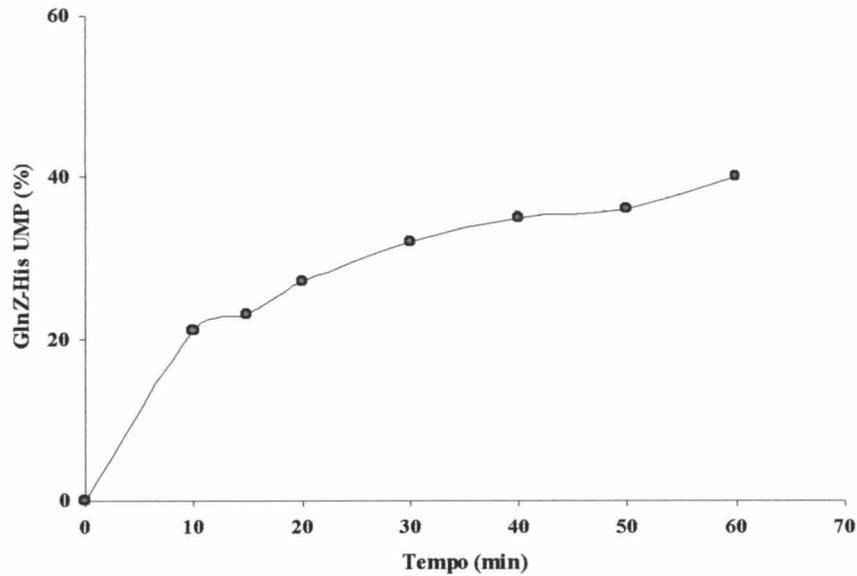
#### 4.6.3.1 Efeito do Tempo de Incubação no processo de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *E. coli*

O efeito do tempo de incubação do sistema de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* pode ser determinado e analisado em eletroforeses desnaturantes Tricina SDS-PAGE. Para a determinação do perfil de uridililação da proteína GlnZ-His durante seu período de incubação no sistema (com a concentração ótima de enzima) e verificar se o tempo utilizado de 30 minutos é mesmo suficiente para a máxima modificação de GlnZ-His, uma curva de tempo, variando de 0 a 60 minutos foi realizada.

Alíquotas do sistema completo de uridililação, contendo 3  $\mu\text{mol/L}$  de GlnZ-His, 0,3  $\mu\text{mol/L}$  de GlnD, 0,1  $\text{mmol/L}$  de ATP e 10  $\text{mmol/L}$  de 2-cetoglutarato, foram retiradas de 5 em 5 minutos ou de 10 em 10 minutos até que se completasse 1 hora e submetidos ao gel desnaturante Tricina SDS-PAGE 25%. Os resultados obtidos, representados pela Figura 28, indicam que o tempo de 30 minutos de incubação dos sistemas de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* é satisfatório uma vez que a taxa de uridililação de GlnZ-His apresentou-se perto da saturação.

#### 4.6.3.2 Efeito do ATP na uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada

O efeito das moléculas moduladoras da atividade da proteína GlnD em uridililar a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* foi examinado. Primeiramente, foi testado o efeito da concentração do efector ATP sob a uridililação da proteína GlnZ-His. Foram utilizadas concentrações crescentes de ATP (0 a 500  $\mu\text{mol/L}$ ) com uma concentração fixa de 10  $\text{mmol/L}$  de 2-cetoglutarato em cada reação. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 29 e apresentam a porcentagem de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* segundo a análise densitométrica dos géis desnaturantes Tricina SDS-PAGE.

FIGURA 28 – EFEITO DO TEMPO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli*

Os géis de Tricina SDS-PAGE resultantes dos experimentos realizados para determinar o efeito do tempo de incubação no processo de uridilação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* (item 4.6.3.1) foram submetidos à análise densitométrica para a determinação da porcentagem de modificação da proteína GlnZ-His. As reações de uridilação foram iniciadas com a adição de 0,3  $\mu\text{mol/L}$  de proteína GlnD aos sistemas e as alíquotas de 15  $\mu\text{L}$  foram retiradas nos tempos indicados. Os resultados apresentados são representativos.

Em detalhe (A) está representado um gel de Tricina SDS-PAGE realizado nas condições experimentais descritas.

Os resultados indicam que o ATP é essencial para a uridililação de GlnZ-His uma vez que na ausência de ATP não há modificação da proteína GlnZ-His detectável. Aparentemente ocorre uma saturação para valores superiores a 100  $\mu\text{mol/L}$  de ATP.

#### 4.6.3.3 Efeito da concentração de 2-cetoglutarato na uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *E. coli*

Foi também analisada a influência do 2-cetoglutarato no processo de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*. Os sistemas de uridililação da proteína GlnZ-His foram submetidos a concentrações crescentes de 2-cetoglutarato (1  $\mu\text{mol/L}$  a 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) e, através da análise densitométrica dos géis desnaturantes correspondente às amostras testadas, os resultados indicaram que a taxa de uridililação da proteína GlnZ-His tende a aumentar juntamente com o aumento da concentração deste modulador (Figura 30) atingindo a saturação em cerca de 100  $\mu\text{mol/L}$ . Nesta mesma concentração de 2-cetoglutarato, aparentemente, a taxa de uridililação da proteína GlnZ-His se estabiliza em cerca de 40%.

#### 4.6.3.4 Efeito da glutamina sob a uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada

O efeito da glutamina sob a uridililação da proteína GlnZ-His foi determinado. Em *Herbaspirillum seropedicae*, a glutamina inibiu a uridililação da proteína GlnB tanto pelo extrato celular deste microrganismo quanto pela proteína GlnD de *E. coli* (BENELLI et al., 2001).

A reação de uridililação da proteína GlnZ-His foi iniciada na presença de 0,1 mmol/L de ATP e 10 mmol/L de 2-cetoglutarato. Após 15 minutos de incubação, a mistura de reação foi dividida em 5 diferentes tubos contendo glutamina na concentração final de 0, 5, 10, 20 e 50 mmol/L. Os resultados deste experimento, apresentados na Figura 31, mostraram que em presença de glutamina ocorreu inibição da uridililação da proteína GlnZ-His pela proteína GlnD de *E. coli* independentemente

da concentração de glutamina utilizada. Os resultados também sugerem que houve a retirada do grupo UMP da proteína GlnZ-His durante a incubação com glutamina. No tampão de uridililação destes ensaios estava presente o  $Mg^{2+}$ , íon essencial para a atividade de uridililtransferase de GlnD (KAMBEROV et al., 1994), porém, os experimentos foram conduzidos na ausência de íons  $Mn^{2+}$ , situação na qual estudos têm reportado que a atividade de enzima removedora de uridilil é nula (KAMBEROV et al., 1995). Desta forma, os resultados obtidos mostram que, na ausência de 2-cetoglutarato, GlnZ-His não é uridililada, situação esta presente em excesso de íons amônio. Entretanto, quando a concentração de 2-cetoglutarato está elevada, a proteína GlnZ-His é uridililada por GlnD sinalizando uma baixa de íons amônio intracelulares. A glutamina exerceu um efeito negativo nestes ensaios.

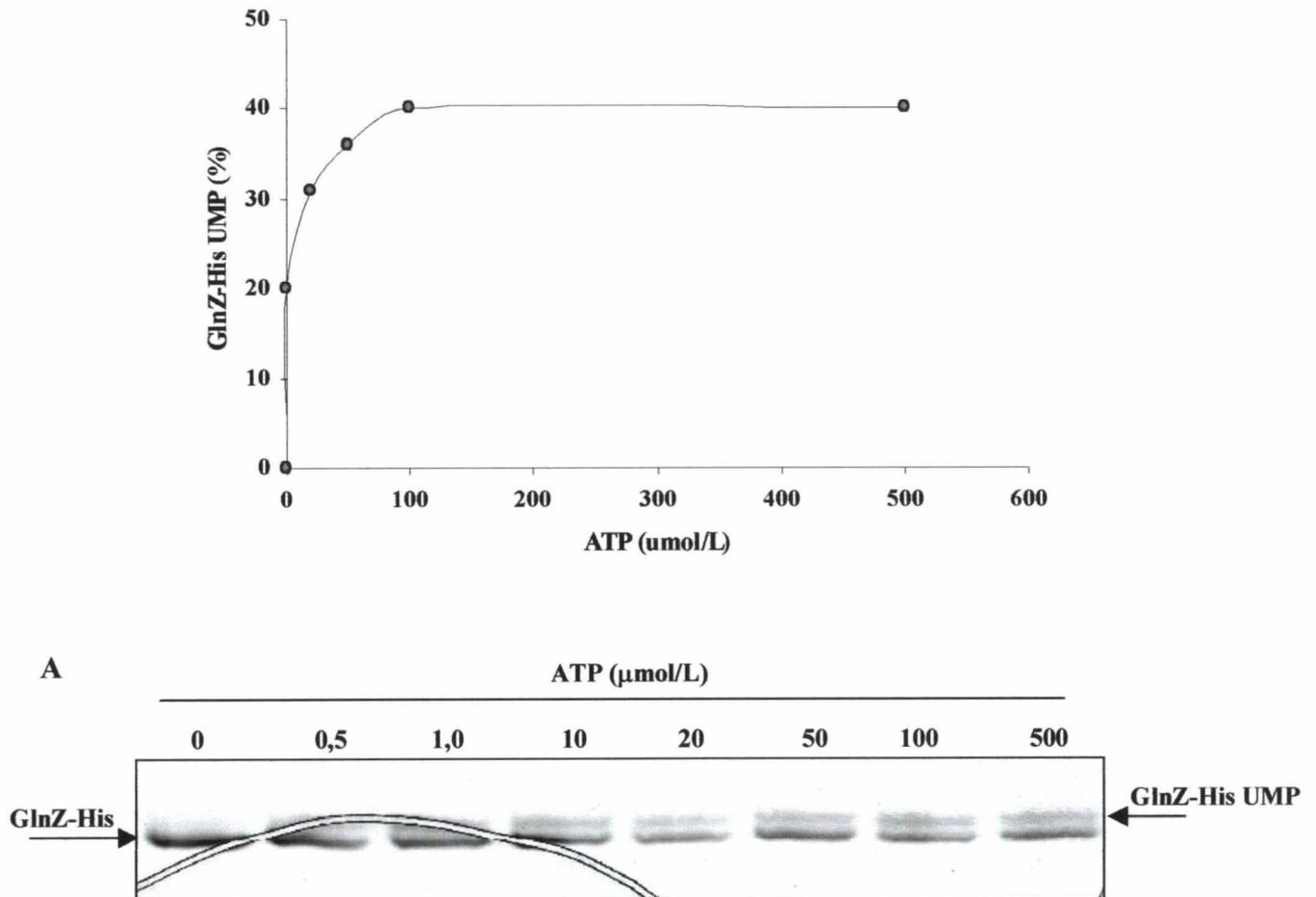
#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense*

As proteínas da família P<sub>II</sub> são proteínas transdutoras de sinal capazes de mediar uma variedade de respostas celulares. Para tanto, estas proteínas interagem diretamente com uma variedade de moléculas efetoras, incluindo o ATP e o 2-cetoglutarato.

A estrutura da proteína GlnB de *E. coli* foi determinada em 1996 por CARR e colaboradores, enquanto que a estrutura de sua paróloga GlnK foi descrita posteriormente (XU et al., 1998). Recentemente, BENELLI e colaboradores (2002) descreveram a estrutura do cristal da proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* e compararam-na com estruturas disponíveis de *E. coli*.

A estrutura primária da proteína GlnZ de *A. brasilense* foi submetida à comparação com seqüências de proteínas da família P<sub>II</sub> de diversos organismos (Figura 32). A proteína GlnZ de *A. brasilense* apresenta 67% de identidade e 87% de similaridade com a proteína GlnK de *E. coli*, esta já bastante caracterizada em termos estruturais (XU et al., 1998), enquanto que apresenta 64% de identidade e 79% de similaridade com a proteína GlnB deste mesmo microrganismo.

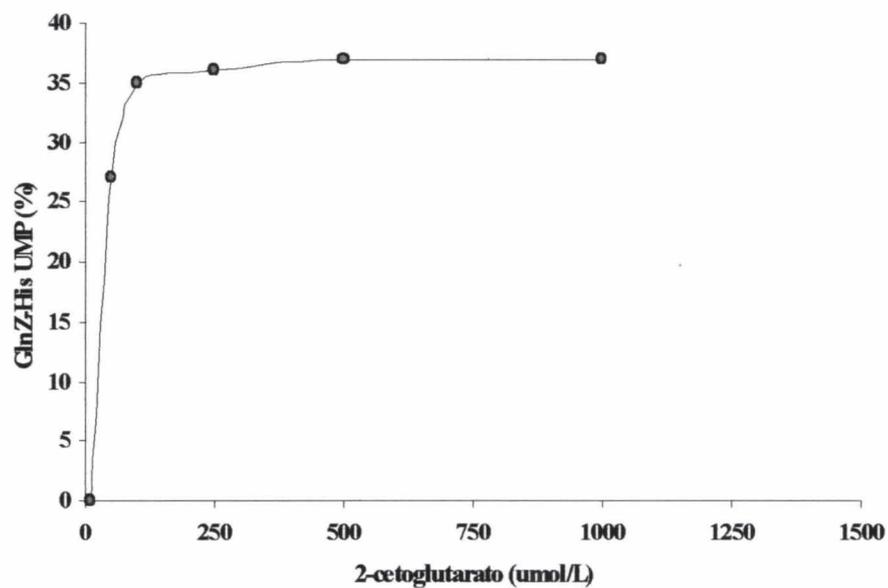
FIGURA 29 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* PELA PROTEÍNA GLND DE *E. COLI*



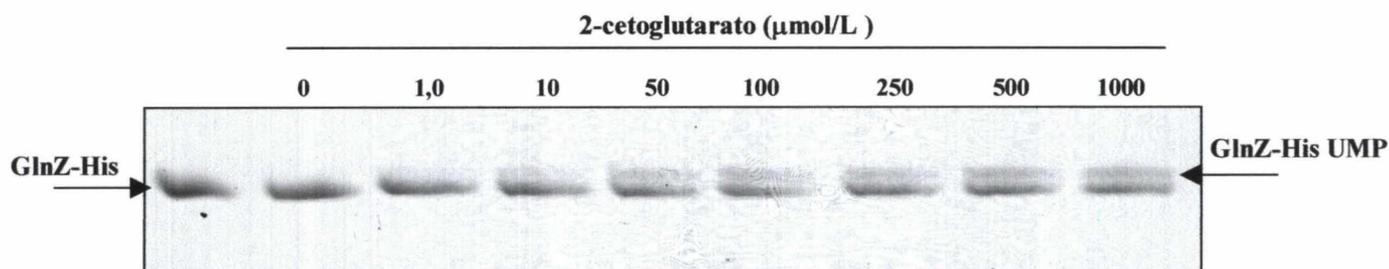
As porcentagens de uridilação da proteína GlnZ-His foram determinadas por densitometria dos géis de Tricina SDS-PAGE realizados, conforme descrito no item 4.6.3.2, para a análise do efeito do ATP no processo de modificação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense*. As concentrações de ATP utilizadas nos sistemas de reação estão indicadas. Os ensaios foram realizados na presença de 10 mmol/L de 2-cetoglutarato, 3 μmol/L de GlnZ-His e 0,3 μmol/L de GlnD.

Os resultados são representativos e em detalhe (A) é mostrado um gel de Tricina SDS-PAGE representando um experimento realizado nas condições descritas.

FIGURA 30 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-CETOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli* PARCIALMENTE PURIFICADA



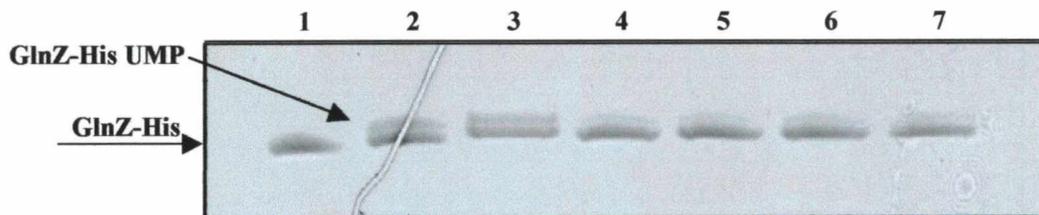
A



A porcentagem de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* foi determinada pela densitometria dos géis desnaturantes de Tricina SDS-PAGE correspondentes aos experimentos realizados que analisaram a influência da concentração do 2-cetoglutarato no processo de uridililação da proteína GlnZ-His (conforme descrito no item 4.6.3.3). As reações de uridililação foram realizadas com 3  $\mu\text{mol/L}$  de GlnZ-His, 0,3  $\mu\text{mol/L}$  de proteína GlnD e 0,1  $\text{mmol/L}$  de ATP. Nos diferentes ensaios, as concentrações de 2-cetoglutarato utilizadas estão indicadas. Este gráfico mostra resultados representativos dos experimentos realizados.

No quadro A está representado um gel Tricina SDS-PAGE realizado nas condições experimentais descritas.

FIGURA 31 – EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense* PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli*



Eletróforese em gel de Tricina SDS-PAGE 25% e proteínas coradas com Coomassie Blue. Na linha 1 tem-se uma fração da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada (3  $\mu\text{mol/L}$ ). Linha 2: alíquota do sistema de uridilação completo (contendo 3  $\mu\text{mol/L}$  de GlnZ-His, 0,3  $\mu\text{mol/L}$  de GlnD, 1  $\text{mmol/L}$  de UTP, 10  $\text{mmol/L}$  de 2-cetoglutarato e 0,1  $\text{mmol/L}$  de ATP) com 30 minutos de incubação (42% de GlnZ-His-UMP, segundo análise densitométrica). Linha 3: fração do sistema de reação de uridilação completo com 15 minutos de incubação (35% de GlnZ-His-UMP, segundo análise densitométrica). Linhas 4, 5, 6 e 7: frações do sistema de uridilação completos com a adição de glutamina, aos 15 minutos de incubação, nas concentrações de 5, 10, 20 e 50  $\text{mmol/L}$ , respectivamente (nenhuma porcentagem de proteína GlnZ-His uridilada detectável). As setas indicam a proteína GlnZ-His não modificada e na sua forma uridilada.

O resultado da comparação das seqüências de aminoácidos das várias proteínas da família P<sub>II</sub> revelou alguns resíduos bastante conservados como, por exemplo, os resíduos de Pro10 e Leu20. A maioria dos resíduos de aminoácidos altamente conservados nas seqüências das proteínas P<sub>II</sub> estão relacionados com o sítio de ligação do ATP (XU et al., 1998). A seqüência <sup>87</sup>G<sup>89</sup>, encontrada na volta B e totalmente conservada nos microrganismos comparados, possui dois resíduos de glicina (Gly87 e Gly 89) que interagem formando pontes de hidrogênio com os fosfatos do ATP e um resíduo de Asp88 que mantém a estrutura desta volta por interagir com os resíduos Thr83 e Gly84. Os resíduos de aminoácidos <sup>90</sup>KIF<sup>92</sup> também são bastante conservados. O resíduo de Lys90 forma uma ponte de hidrogênio com a adenina do ATP enquanto que a Phe92 forma uma ligação de van der Waals com ele. Estas duas seqüências fazem parte da seqüência consenso na região C-terminal, <sup>83</sup>Thr-Gly-X-X-Gly-Asp-Gly-Lys-Ile-Phe<sup>92</sup>, que é característica das proteínas que ligam ATP (XU et al., 1998). Os resíduos de Gly35 e Gly37 também são altamente conservados e bastante próximos ao sítio de ligação ao ATP (considerando a estrutura tridimensional da proteína). Levando em conta estas considerações, pode-se concluir então que o ATP liga-se nas fendas laterais dos monômeros da proteína GlnK de *E. coli*.

Estudos de mutagênese com a proteína GlnB de *E. coli* mostraram que o resíduo de Gly89 é indispensável para a ligação de ATP e também do 2-cetoglutarato nesta proteína (JIANG et al., 1997). A proteína GlnB mutante neste resíduo de aminoácido (G89A) aparentemente perdeu todas as suas funções, ou seja, ela não foi capaz de se ligar aos seus efetores e, desta forma, não interagiu com as proteínas GlnD, ATase e NtrB (JIANG et al., 1997). O papel deste resíduo de glicina na cadeia de aminoácidos da proteína GlnK de *E. coli* parece ter uma forte relação com a conformação da cadeia protéica para interagir com o ATP. Sem a presença deste resíduo, o sítio de ligação do ATP é distorcido uma vez que ela interage com vários resíduos que mantém a ligação entre as voltas B e C. Dentre estas interações, tem-se que a Gly89 forma uma ponte de hidrogênio com a Ile102 . Este resíduo é flanqueado

pelas argininas 101 e 103 que interagem diretamente com o  $\gamma$ -fosfato do ATP (XU et al., 1998). Este trabalho de XU e colaboradores (1998) não colaborou para informar onde de fato encontra-se o sítio de ligação do efector 2-cetoglutarato na proteína GlnK de *E. coli*. Considerando que a ligação do ATP acontece em vários resíduos da volta B e que a ligação do ATP e 2-cetoglutarato é cooperativa na proteína GlnB de *E. coli* (KAMBEROV et al., 1994), pode-se esperar que alterações nos resíduos desta volta irão afetar a afinidade tanto do ATP quanto do 2-cetoglutarato. Quando o resíduo de glicina 37 é alterado na proteína GlnB de *E. coli*, esta mutação, que causa uma distorção na volta T, causa um defeito na ligação do 2-cetoglutarato. A mutagênese da glutamina 39, que estabiliza a conformação da volta T, diminui severamente a interação da proteína GlnB com o 2-cetoglutarato (JIANG et al., 1997), ou seja, mutações na volta T da proteína GlnB de *E. coli* mudaram sua afinidade pelo efector 2-cetoglutarato. Portanto, a volta T de GlnK, bastante flexível, seria um possível sítio de ligação para o 2-cetoglutarato que, complexado à proteína, estabilizaria sua conformação. BENELLI e colaboradores (2002) compararam a estrutura tridimensional da proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* com algumas enzimas envolvidas na isomerização de  $\alpha$ -ceto ácidos para propor sítios de ligação para o ATP e 2-cetoglutarato nesta proteína. Sobrepondo a proteína GlnB de *H. seropedicae* com a proteína 4-oxalocrotonato tautomerase ligada ao inibidor 2-oxo-3-pentinoato sugeriu-se que o sítio de ligação do 2-cetoglutarato nesta proteína diazotrófica seria ao redor das fendas laterais dos monômeros da proteína GlnB (resíduos Lys90 e Arg101). Comparações entre as proteínas GlnB de *H. seropedicae*, GlnK-ATP e GlnB-ATP de *E. coli* e a 4-oxalocrotonato tautomerase ligada ao inibidor 2-oxo-3-pentinoato sugeriram que, embora os sítios de ligação do ATP e 2-cetoglutarato na proteína GlnB de *H. seropedicae* estejam em fendas laterais, eles não são superponíveis. A posição do sítio de ligação do 2-cetoglutarato em *H. seropedicae* está de acordo com os dados obtidos por JIANG e colaboradores (1997) em seus estudos de mutagênese com a proteína GlnB de *E. coli* (BENELLI et al., 2002).

A proteína GlnZ de *A. brasilense* possui, em sua estrutura primária, todos os

resíduos de aminoácidos altamente conservados dentro das proteínas da família P<sub>II</sub> que estão relacionados com a complexação dos efetores ATP e 2-cetoglutarato em sua estrutura, sugerindo, então, que a proteína GlnZ de *A. brasilense* é capaz de se ligar a estas moléculas sinalizadoras indispensáveis no seu processo de uridililação.

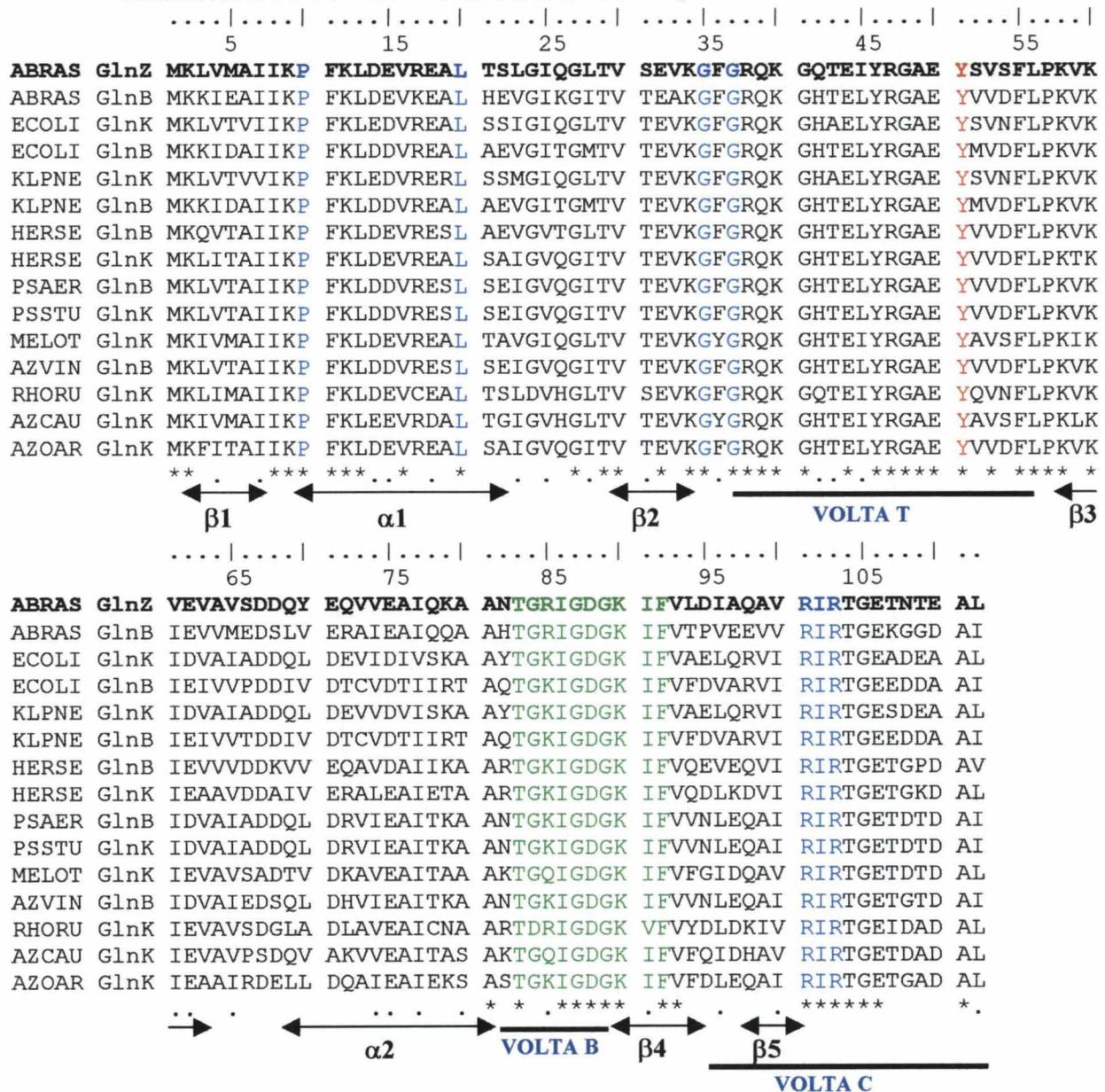
Na volta T da proteína GlnZ de *A. brasilense*, assim como na sequência das outras proteínas P<sub>II</sub> analisadas, observa-se o resíduo de Tyr51. Este resíduo é o resíduo uridililado pela proteína GlnD na maioria das proteínas da família P<sub>II</sub>. JIANG e colaboradores (1997) mutagenizaram os resíduos 47 a 53 do ápice da volta T e observaram que a proteína GlnB de *E. coli* continuou ligando tanto o ATP quanto o 2-cetoglutarato, porém ela não foi capaz de ser uridililada pela proteína GlnD nem de ativar as proteínas ATase ou NtrB.

#### 4.8 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense*

A proteína GlnZ-His de *A. brasilense* purificada a partir da estirpe de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais em coelhos. Estes anticorpos são de grande importância uma vez que estudos de reconhecimento e interação da proteína GlnZ-His com outras proteínas do metabolismo nitrogenado poderão ser realizados. Dois métodos foram utilizados para a produção dos anticorpos contra a proteína GlnZ-His de *A. brasilense*.

Para analisar os anticorpos produzidos, ensaios de imunodeteção foram realizados. A análise destes ensaios realizados com os anticorpos produzidos através da metodologia com o tratamento com glutaraldeído indicou baixa taxa de reconhecimento contra a proteína GlnZ-His provavelmente devido a um baixo título de anticorpos anti-GlnZ (dados não mostrados).

FIGURA 32 – COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnZ DE *A. brasilense* COM SEQUÊNCIAS DE OUTRAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA P<sub>II</sub>



As seqüências de aminoácidos das proteínas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Os asteriscos indicam aminoácidos idênticos e os pontos indicam substituições de aminoácidos do mesmo grupo. Os resíduos marcados em azul são aqueles altamente conservados. O resíduo de Tyr51 está marcado em vermelho. A sequência destacada em verde é conservada em todas as proteínas da família P<sub>II</sub> e constitui parte do sítio de ligação para o ATP. ABRAS – *A. brasilense*; ECOLI – *E. coli*; KLPNE – *K. pneumoniae*; HERSE – *H. seropedicae*; PSAER – *P. aeruginosa*; PSSTU – *P. stutzeri*; MELOT – *M. loti*; AZVIN – *A. vinelandii*; RHORU – *R. rubrum*; AZCAU – *A. caulinodans*; AZOAR – *Azoraculus*.

Na tentativa de aumentar a resposta imune contra a proteína GlnZ foi utilizado o adjuvante de Freund. O resultado da imunodeteção (Figura 33) mostra que o anticorpo reconheceu a proteína GlnZ-His, presente no extrato celular (linha 2) ou purificada (linha 3), e também a proteína GlnZ na sua forma nativa, presente no extrato celular (linha 5) ou purificada (linha 6), indicando que o reconhecimento dos anticorpos não foi feito através da sua ligação com a cauda de histidinas presente nas proteínas utilizadas durante as injeções.

Esse anticorpo reconheceu em menor proporção, outras proteínas de *E. coli* (dados não mostrados), e, devido a isso, a solução diluída do anticorpo foi tratada previamente com o extrato celular de *E. coli* que não possuía a proteína GlnZ-His com a finalidade de retirar anticorpos não específicos para a proteína de interesse.

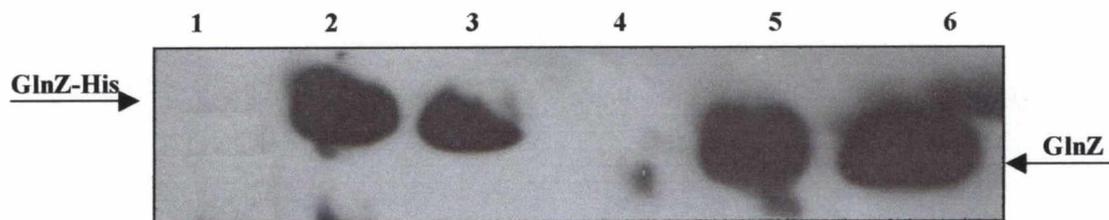
O anticorpo produzido contra a proteína GlnZ-His também foi capaz de reconhecer a proteína GlnB de *Azospirillum brasilense* (dados não mostrados), porém este resultado já era esperado uma vez que estas duas proteínas apresentam mais de 80% de similaridade.

Os anticorpos produzidos serão utilizados em estudos de interação da proteína GlnZ com outras proteínas do metabolismo nitrogenado.

Neste trabalho, a proteína GlnZ de *A. brasilense* foi expressa em *E. coli* na sua forma nativa ou ligada a uma sequência contendo seis resíduos de histidina. Ambas as formas foram purificadas e analisadas *in vitro*. Foi verificado que as proteínas GlnZ e GlnZ-His podem ser uridililadas *in vitro* pela proteína GlnD de *E. coli* ou *A. brasilense*. Este processo é dependente de ATP, 2-cetoglutarato e glutamina, sendo que esta última atua na inibição de GlnD.

Para a realização deste estudo foram implantadas neste laboratório técnicas de eletroforese que permitiram a visualização da uridililação da proteína GlnZ na ausência de material radioativo.

FIGURA 33 – ENSAIO DE RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PRODUZIDOS CONTRA A PROTEÍNA GlnZ-HIS DE *A. brasilense*



A imunodeteccção foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos utilizando um gel de poliacrilamida glicina SDS-PAGE 15% e transferência para nitrocelulose. As linhas 1 e 4 mostram os extratos protéicos totais de células *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* transformadas com o vetor pET28a e pT7-7, respectivamente, e induzidas com lactose. Nas linhas 2, 3, 5 e 6 têm-se frações das proteínas GlnZ na sua forma His-tag (linhas 2 e 3) ou nativa (linhas 5 e 6) tanto presentes no extrato celular (linhas 2 e 5) quanto purificadas (linhas 3 e 6). Em cada linha foram aplicados cerca de 20  $\mu$ g de proteína. A revelação foi feita por quimioluminescência e visualizada em filme de raio X. As setas indicam as proteínas GlnZ e GlnZ-His.

## 5. CONCLUSÕES

- A proteína GlnZ de *A. brasilense* foi superexpressa na sua forma nativa e His tag em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e RB9065( $\lambda$ DE3) com boas taxas de indução;
- A proteína GlnZ nativa de *A. brasilense* foi purificada em dois passos cromatográficos, em uma coluna de troca iônica (Q-sepharose) e em uma coluna de afinidade (HiTrap Heparin), e apresentou uma pureza de 97%;
- A proteína GlnZ-His de *A. brasilense* foi purificada em apenas um passo cromatográfico, na coluna de afinidade HiTrap-Chelating-Ni<sup>+2</sup>, e apresentou um grau de pureza de 99%;
- A proteína GlnZ nativa purificada foi uridililada pelo extrato total de *A. brasilense* crescido na presença ou ausência de amônia e pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada;
- O processo de uridililação da proteína GlnZ-His de *A. brasilense* parece ser dependente de 2-cetoglutarato e ATP, entretanto, é inibido por glutamina;
- Os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína GlnZ-His de *A. brasilense* a reconheceram tanto na sua forma nativa quanto His-Tag.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the P<sub>II</sub> regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6264-6272, 1975.

ARAUJO, M. S. Clonagem e expressão do gene *glnZ* de *Azospirillum brasilense*. **Monografia** – Bacharel em Ciências Biológicas. Setor de Ciências biológicas, UFPR; 2000.

ARCONDÉGUY, T.; HUEZ, I.; FOURMENT, J.; KAHN, D. Symbiotic nitrogen fixation does not require adenylation of glutamine synthetase I in *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 145, p. 33 – 40, 1996.

ARCONDÉGUY, T.; van HEESWIJK, W. C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 263-270, 1999.

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

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

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 179, p. 339-343, 1999.

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). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

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

ATKINSON, R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.** v. 32, p. 301-313, 1999.

AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NIFA and NIFL *in vitro*. **Eur. J. Biochem.** v. 187, p. 353-360, 1990.

BENELLI, E. M. Análise funcional e estrutural da proteína controladora dos Sistemas Ntr e Nif, a proteína PII de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Doutorado em Ciências – Bioquímica**, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1997.

- BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 4623-4626, 1997.
- BENELLI, E. M. SOUZA, E. M.; BONATTO, A. C.; BUCK, M.; MOORE, M.; HARPER, A.; POLIKARPOV, I.; PEDROSA, F. O. Role of PII protein as a signal of nitrogen level in *Herbaspirillum seropedicae*. In: **Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity**. PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 105 – 106, 2000.
- BENELLI, E.M.; BUCK, M.; SOUZA, E.M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F.O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, 47, 309-14, 2001.
- BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 3296 – 3303, 2002.
- BLAUWKAMP, T. A.; NINFA A. J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 203–214, 2002.
- BOZOULIAN, H.; ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimic.**, v. 68, p. 1181 – 1187, 1986.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the P<sub>II</sub>-regulatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 68, p. 2949-2953, 1971.
- BUCK, M.; MILLER, S.; DRUMMOND, M.; DIXON, R. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. **Nature**, v. 320, p. 374 – 378, 1986.
- BUCK, M.; CANNON, W. Specific binding of the transcription factor  $\sigma^{54}$  to promoter DNA. **Nature**, v. 358, p. 422 – 424, 1992.
- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of the *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 164, p. 816-822, 1985.
- BURNETTE, W. N. “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195-203, 1981.
- CARR, P. D.; CHEAH, P. M.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. X-Ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1,9 Å. **Acta Cryst.**, v. D52, p. 93 – 104, 1996.

- CHEAH, E.; CARR, P. D.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein P<sub>II</sub>. **Structure**, v. 2, p. 981-990, 1994.
- COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, n. 4, p. 536-545, 2002.
- CRUZ L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 5, p. 2375-9, 2001.
- DEAN, R. D.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metallocluster: structure, organization and synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6737, 1993.
- de MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S.; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the P<sub>II</sub> protein from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, 1994.
- de ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*) of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Mol. Gen. Genet.**, v. 220, n. 1, p. 88-94, 1989.
- de ZAMAROCZY, PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Function organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 2507-2515, 1993.
- de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different P<sub>II</sub> proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4143-4149, 1996.
- de ZAMAROCZY, M.; ELMERICH, C. Regulatory roles of the structural homologues P<sub>II</sub> and P<sub>Z</sub> proteins in *Azospirillum brasilense*. In: **11<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation**, Paris, France, p.12, 1997.
- de ZAMAROCZY, M. Structural homologues P<sub>II</sub> and P<sub>Z</sub> of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 449-463, 1998.
- DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., elevation of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Comglomeromonas*, *Comglomeromonas parooensis* sp. nov. **System. Appl. Microbiol.** v. 20, p. 72 – 77, 1997.
- DIXON, R.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; HILL, S.; KIM, S. O.; MACHEROUX, P.; POOLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; SOBZCYK, A.; SODERBACK, E. Regulation of *nif* gene expression in free-living diazotrophs: recent advances. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W. (Eds.) **Biological nitrogen fixation in the 21<sup>st</sup> century**. Kluwer Academic, p. 87-92, 1997.
- DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E. E NYMAN, C. J. (Eds.) **Proceedings of the 1<sup>st</sup> Intl. Symp. Nitrogen Fixation**. v. 2, Pullman, Washington Univ. Press., p. 518 – 538, 1976.

- DOBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRUPPER, H. G.; DWORKING, M.; HARDER, W. (Eds.). **The Prokaryotes**. 2<sup>a</sup> ed., v. 3, p. 2236 – 3353, 1991.
- DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, v. 301, p. 302-307, 1983.
- EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W.J. ; PÜHLER, A., (Eds). **Nitrogen fixation**. Oxford: Clarendon Press, v. 4, p. 1-49, 1986.
- ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p. 17 – 26, 2001.
- ELMERICH, C.; GALIMAND, M.; VIEILLE, C.; DELORME, F.; de ZAMAROCZY, M. Nitrogen fixation genes of *Azospirillum*. In: BOTHE, H. O.; de BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. (Eds). **Nitrogen fixation: hundred years after**. Nova York: Gustav Fischer, p. 327-331, 1988.
- ELMERICH, C.; de ZAMAROCZY, M.; ARSÈNE, F.; PEREG, L.; PAQUELIN, A.; KAMINSKI, A. Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 847-852, 1997.
- FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *A. brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 281 – 288, 1999.
- FISCHER, H-M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.
- FISCHER, H. M. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 352-386, 1994.
- FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-Status. **J. Bacteriol.**, v. 176-1, p. 84-91, 1994.
- FORCHHAMMER, K.; HEDLER, A. Phosphoprotein PII from cyanobacteria – analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v. 244, p. 869 – 875, 1997.
- FORCHHAMMER, K.; HEDLER, A.; STROBEL, H.; WEISS, V. Heterotrimerization of PII-like signaling proteins: implication for PII-mediated signal transduction system. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 338-349, 1999.
- FRAZZON, J.; VEDOY, C.; PASSAGLIA, M. P.; SHRANK, T. S. Organization of nitrogen fixation genes on *Azospirillum brasilense* genome. In: **International symposium on sustainable agriculture for the tropics: the role of biological nitrogen fixation**. Angra dos Reis, p. 112-113, 1995.

FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P.; BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4679-4685, 1989.

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

GOLDENBERG, D. P. Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. In: **Protein Structure, a practical approach**. Edited by TE Creighton. IRL Press. Oxford, 1989.

HE, L.; SOUPENE, E.; KUSTU, S. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7446-7455, 1997.

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

HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biol. Fertil. Soils**, v. 41, n. 3, p. 281-288, 1999.

HOLTEL, A. H.; M. MERRICK. Identification of the *Klebsiella pneumoniae* *glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. **Mol. Gen. Genet.**, v. 215, p. 134-138, 1988.

HOWARD, J. B. REES, D. C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 235-264, 1994.

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

HSIEH, M. H.; LAM, H. M.; van de LOO, F. J.; CORUZZI, G. A PII-Like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 95, p. 13965 – 13970, 1998.

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

JAGGI, R.; YBARLUCEA, W.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; EDWARDS, K.J.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The role of the T-loop of the signal transducing protein P<sub>II</sub> from *Escherichia coli*. **FEBS Lett.**, v. 391, p. 223-228, 1996.

JAIN, D. K.; PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat roots hairs. **Can. J. Microbiol.**, v. 31, p. 206 – 210, 1985.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S; TIRASOPHON, W.; CHANDRAN, P.; SCHEFKE, B. K.; NINFA, A. J. Structure/function analysis of the P<sub>II</sub> signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interaction with protein receptors. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4342-4353, 1997.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyl-transferase/uridylyl-removing enzyme (E.C.2.7.7.59) of

- Escherichia coli* and its interaction with the P<sub>II</sub> protein. **Biochemistry**, v. 37, p. 12782-12794, 1998a.
- JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. **Biochemistry**, v. 37, p. 12802-12810, 1998b.
- JIANG, P.; NINFA, A. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the P<sub>II</sub> signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1906-1911, 1999.
- JOHANNSSON, M.; NORDLUND, S. Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 142, p. 1265 – 1272, 1996.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Mol. Cell. Biol. Res.**, v. 40, p. 175-191, 1994.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* P<sub>II</sub> signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17797-17807, 1995.
- KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 4976-4980, 1988.
- KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** V. 140, p. 679 – 694, 1989.
- KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p.389-397, 1994.
- KLIPP, W.; DREPPER, T.; GROB, S.; MASEPOHL, B.; RAABE, K.; RIEDEL, K. U.; YAKININ, A. F.; HALLENBECK, P. C. Genetics of nitrogen fixation in *Rhodobacter capsulatus*: ammonium and molybdenum control of both nitrogenase systems. In: **Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity**. PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Eds.) Kluwer Academic Publisher, p. 141 – 142, 2000.
- KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; INABA, J.; PEDROSA, F. O. Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6710-6713, 2001.
- KRANZ, R. G.; PACE, V. M.; CALDICOTT, I. M. Inactivation, sequence and *lac* fusion analysis of a regulatory locus required for repression of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 53 – 62, 1990.
- KRIEG, N. N.; DOBEREINER, J. Genus *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Dobereiner 1979, 79AL (Effective publication: Tarrand, Krieg and Dobereiner 1978, 948). In: HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians and Wilkins, 1984. V. 1, p. 94 – 104.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.
- LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2735-2744, 1991.
- LIANG, Y. Y.; DE ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 79, p. 113 – 119, 1992.
- LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense*. Their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Mol. Gen. Genet.**, v. 240, p. 188-196, 1993.
- LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; VAN HEESWIJK, W.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the P<sub>II</sub> regulatory protein. **EMBO J.** v. 19, p. 6041-6059, 2000.
- LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. **Curr. Top. Cell. Regul.**, v. 30, p. 23-56, 1989.
- LUDDEN, P. W. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 138, p. 023-029, 1994.
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 549-553, 1991.
- MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v.41, p.674-684, 1995.
- MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Bras. Ciên.** V. 55, p. 471 – 430, 1983.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- MARTIN, G. B.; TOMASHOW, M. F.; CHELM, B. K. *Bradyrhizobium japonicum* *glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 5638 – 5645, 1989.
- MARTIN, D.E.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Occurrence of three P<sub>II</sub>-like signal transmitter proteins in the diazotrophic proteobacterium *Azoarcus* sp. BH72. **Mol. Microbiol.** v. 38, p. 276-288, 2000.
- MASEPOHL, B.; KREY, R.; KLIPP, W. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2667-2675, 1993.

- MELETZUZ, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-Amt* operon of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v.180, p. 3260-3264, 1998.
- MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. (Eds). **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p. 293-302, 1988.
- MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. ; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, p. 835-876, 1989.
- MERRICK, M. J. **Organisation and regulation of nitrogen fixation genes**. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (Eds.), **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publisher, p. 1-12, 1992.
- MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The helix-turn-helix motif of sigma 54 is involved in recognition of the -13 promoter region. **J. Bacteriol.**, v. 174 n. 22, p. 7221-6, 1992
- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A.. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 604-622, 1995.
- MICHEL-REYDELLET, N.; DESNOUES, N.; ELMERICH, C.; KAMINSKI, P.A. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* *glnB* and *glnA* genes: involvement of the P<sub>II</sub> protein in symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 3580 – 3587, 1997.
- MICHEL-REYDELLET, N.; DESNOUES, N.; de ZAMAROCZY, M.; ELMERICH, C.; KAMINSKI, P.A. Characterization of the *glnK-Amt* operon and involvement of *Amt* in methylammonium in *Azorhizobium caulinodans*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 258, p. 671-677, 1998.
- MILCAMP, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Identification of a *nifW*-like gene in *Azospirillum brasilense*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1173, p. 237-238, 1993.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letter**, v. 447, 283-286, 1999a.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. *In-trans* regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999b.
- MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; CHUBATSU, L. S. Isolation of recombinant plasmids for rapid analysis using a sodium dodecyl sulfate/potassium chloride precipitation. **Anal. Biochem.**, v. 292, p. 169-170, 2001.
- MORETT, E.; BUCK, M. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase- $\sigma^{54}$  with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open complex. **J. Mol. Biol.**, v. 210, p. 65-77, 1989.
- MORETT, E.; SEGOVIA, L. The  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action of phylogenetic relationship of their functional domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.

- NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. P<sub>II</sub> signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 172-179, 2000.
- NOINDORF, L. Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2002 **Tese de Mestrado em Ciências – Bioquímica**, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant Soil.**, v. 90, p. 3-16, 1986.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v. 63, p. 366-370, 1997.
- PASSAGLIA, L. M.; NUNES, C. P.; ZAHA, A.; SCHRANK, I. S. The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes *H*, *D*, *K*, an 353 bp orf and gene *Y*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, n. 7, p. 649-75, 1991.
- PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984.
- PEDROSA, F. O. Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum brasilense* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 6, 354 – 384, 1988.
- PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G. WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 9, p. 189-195, 2001.
- PERLOVA, O.; URETA, A.; NORDLUND, S.; MELETZUS, D. Identification and characterization of genes involved in the ammonium sensing mechanism in *Acetobacter diazotrophicus*. In: **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Eds.), Kluwer Academic Publisher, 1999.
- POPHAM, D. L.; SZETO, D.; KEENER, J.; KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein binds to transcriptional enhances. **Sciences**, v. 243, p. 629 – 635, 1989.
- POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1982.
- QUIAN, Y.; TABITA, F. R. Expression of *glnB* and *glnB*-like gene (*glnK*) in a ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4644 – 4649, 1998.
- QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; RICE, D.; HASELKORN, R.; ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, v. 64, n. 7, p. 495-502, 1982.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-

fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca*). **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 37, p. 43 – 51, 1987.

REITH, M.; MUNHOLLAND, J. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. **Plant. Mol. Biol. Rep.**, v. 13, p. 333 – 335, 1995.

REITZER, L. J.; MAGAZANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p. 1979 -1983, 1985.

ROBERTS, G. P.; MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 136, p. 267 – 279, 1978.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUNATILAKA, M. K.; HINES, E. R.; KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 812-820, 2002.

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

SANTERO, E.; HOOVER, T.; KEENER, J.; KUSTU, S. *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 7346-7350, 1989.

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

SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; DE ARAUJO, E. F.; SANTOS, D. S. Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the *nif* structural genes. **Braz. J. Med. Biol Res.**, v. 20, n. 3-4, p. 321-30, 1987.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166; p. 368-379, 1987.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095 – 1096, 1984.

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

SMITH, B. E.; EADY, R.R. Metallocluster of the nitrogenases. **Eur. J. Biochem.**, v. 205, n. 1, p. 1 – 15, 1992.

SON, H.S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: Purification and properties of P<sub>II</sub> protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8690-8695, 1987.

SOUZA, E. .M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 425 – 429, 1991.

- SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.** 181, 681-684, 1999.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 24, p. 487-506, 2000.
- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. **Can. J. Microbiol.** V. 24, p. 967-980, 1978.
- TATÉ, R.; RICCIO, A.; MERRICK, M.; PATRIARCA, E. J. The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 11, p. 188-198, 1998.
- THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet**, v.16, p.11-14, 2000.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 1016 – 1024, 1979.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 22. p. 4673-80, 1994.
- van DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, n. 5, p. 813-20, 2002.
- van HEESWIJK, W.; HOVING, S.; MOLENAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative P<sub>II</sub> protein the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 21, p. 133-146, 1996.
- van HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducer P<sub>II</sub> (GlnB) form heterotrimers *in vivo*: Fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 3942-3947, 2000.
- VASUDEVAN, S.G.; GEDYE, C.; DIXON, N. E.; CHEAH, E.; CARR, P. D. SUFFOLK, P. M.; JEFFREY, P. D.; OLLIS, D. L. *Escherichia coli* P<sub>II</sub> protein: purification, crystallization and oligomeric structure. **FEBS Lett.**, v. 337, p. 255-258, 1994.
- WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. D.; BUCK M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.** v. 35, p. 756-764, 2000.
- XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; van HEESWIJK, W. C.; WESTHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. GlnK, a P<sub>II</sub>-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.**, v. 282, p. 149-165, 1998.

XU, Y.; CARR, P. D.; HUBER, T.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. The structure of the P<sub>II</sub>-ATP complex. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2028 – 2037, 2001.

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

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

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

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense ntrBC* mutants: ammonium and anaerobic switch-off occurs through independent signal transduction pathways. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 5780-5787, 1994.

ZHANG, Y.; CUMMINGS, A. D.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Effects of an *ntrBC* mutants on the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5322-5326, 1995.

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

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Effect of the P<sub>II</sub> and its homolog GlnK on reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase by heterologous expression of the *Rhodospirillum rubrum* dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase-dinitrogenase reductase-activating glyhodrolase regulatory system in *Klebsiela pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 1610-1620, 2001a.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P.; Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J. Bacteriol.** v.183, p. 6159-6168, 2001b.

ZINCHENKO, V.; CHURIN, Y.; SHETOPALOV, V.; SHESTAKOV, S. Nucleotide sequence and characterisation of *Rhodobacter sphaeroides glnB* and *glnA* genes. **Microbiology**, v. 140, p. 2143 – 2151, 1994.