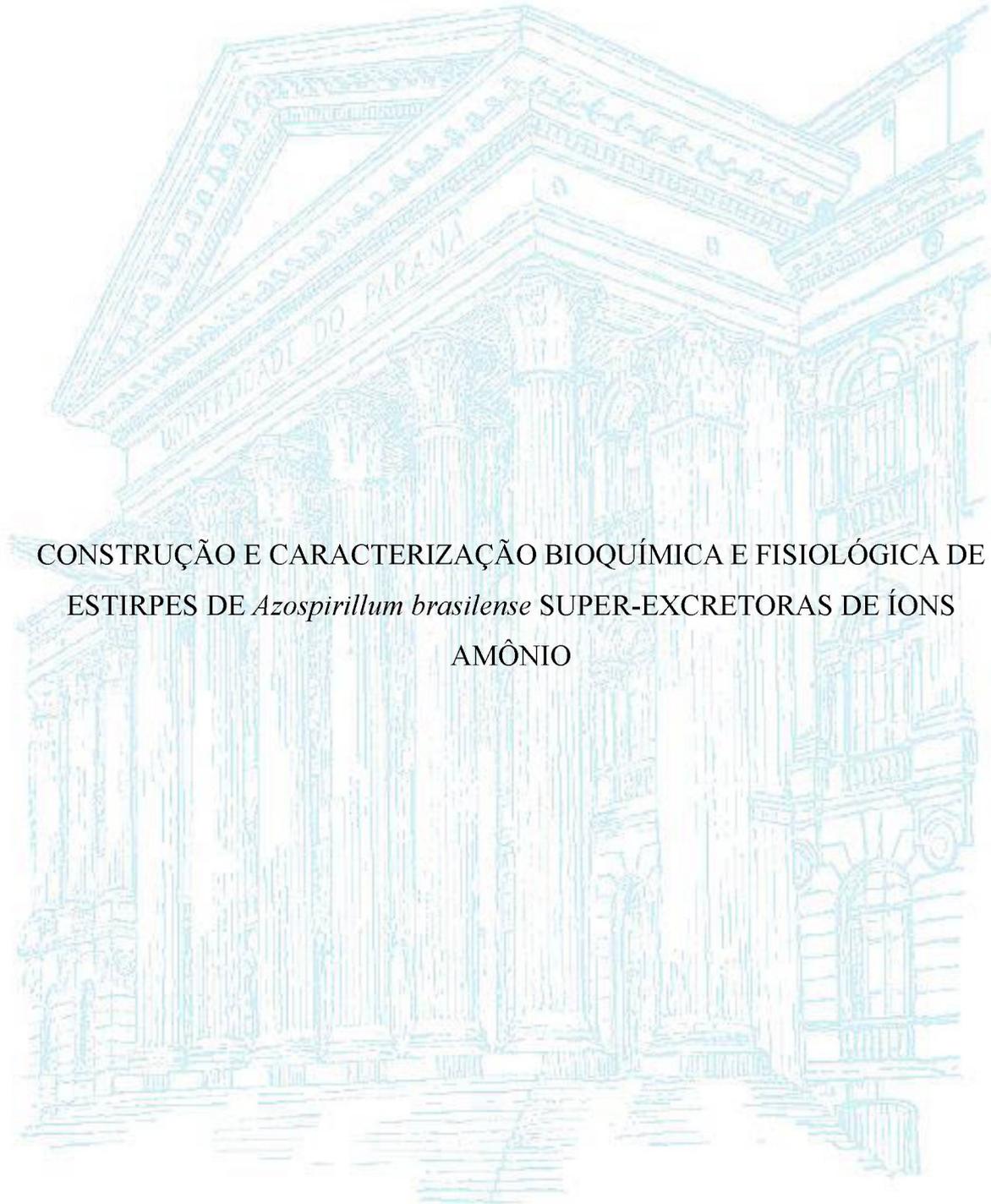


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO MOIA APOLONIO



CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DE  
ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* SUPER-EXCRETORAS DE ÍONS  
AMÔNIO

CURITIBA

2022

THIAGO MOIA APOLONIO

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DE  
ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* SUPER-EXCRETORAS DE ÍONS  
AMÔNIO

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica pelo Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientador: Dr. Adriano Alves Stefanello

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Apolonio, Thiago Moia

Construção e caracterização bioquímica e fisiológica de estirpes de *Azospirillum brasilense* super-excretoras de íons amônio / Thiago Moia Apolonio. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

Co-orientador: Dr. Adriano Alves Stefanello.

1. Glutamato-amônia ligase. 2. *Azospirillum brasilense*. 3. Fixação de nitrogênio. I. Souza, Emanuel Maltempi de, 1964-. II. Stefanello, Adriano Alves, 1990-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THIAGO MOIA APOLONIO** intitulada: **Construção e caracterização bioquímica e fisiológica de estirpes de *Azospirillum brasilense* super-excretoras de íons amônio**, sob orientação do Prof. Dr. EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 23 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

24/09/2022 13:19:42.0

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/09/2022 21:02:19.0

LUCIANO FERNANDES HUERGO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/09/2022 11:51:05.0

FREDERICO JOSÉ GUEIROS FILHO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

23/09/2022 21:24:57.0

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Prof. Emanuel Maltempi de Souza, pela confiança, orientação e incentivo durante os últimos seis anos e meio, desde o início do mestrado; e ao prof. Fábio de Oliveira Pedrosa, por ajudar a idealizar parte deste projeto.

Ao Dr. Adriano Alves Stefanello, pela disposição em me co-orientar e por todo o suporte, principalmente durante a escrita do projeto e da tese de doutorado. Sua ajuda com certeza fez toda a diferença nesta reta final.

Aos meus pais, Valdemir Lopes Apolonio e Ivonete Moia Apolonio, por sempre acreditarem em meu potencial e por muitas vezes abdicarem de seus próprios sonhos em prol dos meus. Eu não teria chegado até aqui se não fosse por vocês.

Ao meu irmão, Rafael Moia Apolonio, por ser meu grande amigo, confidente e porto seguro nos momentos mais desafiadores e frustrantes durante o curso do doutorado. Sem seu apoio sincero e diário eu não teria chegado até aqui.

Ao Prof. Ray Dixon por me receber em seu laboratório no instituto de pesquisa John Innes Centre (JIC), onde executei a maior parte deste projeto durante os meus 2 anos de estadia no Reino Unido. Obrigado por toda a orientação, disponibilidade e também pelos momentos de descontração. Certamente minha experiência durante o doutorado sanduíche foi a melhor possível.

Ao Dr. Marcelo Bueno Batista, por toda a ajuda durante a minha estadia no Reino Unido, tanto dentro quanto fora do laboratório, principalmente nos primeiros meses quando tudo ainda era muito novo.

Às professoras Rose Adele Monteiro e Roseli Wassem, por terem aceitado participar da banca de avaliação do meu projeto e da qualificação de doutorado, e também pelas contribuições científicas.

Aos colegas do Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN) da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda durante as tarefas experimentais cotidianas, mas também pelos momentos de confraternização que certamente ajudaram a aliviar a enorme pressão atrelada à carreira de pesquisador.

Aos professores, técnicos e colegas do JIC, que sempre foram muito solícitos e receptivos durante todo o meu período no exterior.

Aos professores e técnicos do Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica da UFPR, especialmente ao Prof. Rodrigo Vassoler, pela ajuda com os últimos experimentos do doutorado; e aos técnicos Dona Roseli Prado e ao Dr. Valter Baura, por estarem sempre presentes e providenciando soluções muito úteis para os problemas do dia a dia no laboratório, e também por todos os ensinamentos.

À Dr. Edileusa Gerhardt, pelo auxílio experimental e discussões nos últimos meses do doutorado, principalmente pelas análises de MALDI-TOF.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida, ao CNPq, ao INCT-FBN e ao BBRSC pelo suporte financeiro aos dois laboratórios nos quais desenvolvi pesquisa.

## RESUMO

O melhoramento da capacidade de liberação de nitrogênio fixado por bactérias diazotróficas que se associam naturalmente a diversas gramíneas de interesse comercial, como *Azospirillum brasilense*, representa uma solução a curto prazo para a crise do nitrogênio, causada pelo uso excessivo de fertilizantes químicos nitrogenados nas lavouras. Entretanto, devido ao alto custo energético para a célula, os processos de fixação e assimilação de nitrogênio nesse organismo são altamente controlados por vias regulatórias que asseguram que o nitrogênio fixado seja prontamente assimilado em biomassa ao invés de ser excretado para o ambiente. Com o intuito de atenuar esses circuitos regulatórios, neste estudo foi realizada a mutagênese do regulador central da transcrição dos genes *nif*, NifA, através da inserção de mutações pontuais e deleções de trechos específicos em seu domínio regulatório GAF e Q-linker, os quais parecem ser importantes para a formação do complexo inativo da proteína em resposta aos níveis de amônio. Realizou-se também a deleção do gene *draT*, que codifica para a enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase, responsável por fazer a modificação pós-traducional da proteína NifH através da adição de um grupo ADP-ribosil, inativando-a sob altos níveis de amônio. Da mesma forma, foi feita a alteração da enzima glutamina sintetase (GS) envolvida nas vias de assimilação de amônio, através da inserção da mutação pontual P347L; a deleção do domínio N-terminal com atividade adenilil-removase da proteína bifuncional de modificação pós-traducional GlnE, que regula a atividade de GS; e a introdução de mutações inativadoras no domínio com atividade uridilil-removase de GlnD, responsável por fazer a integração de sinais metabólicos que levam ao controle da atividade de GS através da adenililação de seus monômeros. Os resultados mostraram que a alteração da cascata de sinalização por glutamina através da modificação das atividades AR e UR de GlnE e GlnD, respectivamente, ou da adição da substituição P347L, permitiu a detecção de atividade de nitrogenase constitutiva e excreção de quantidades de amônio a níveis milimolares. Adicionalmente, a incorporação de mutações pontuais em NifA gerou variantes menos responsivas à disponibilidade de nitrogênio e/ou PII, e, quando inseridas no genoma das estirpes excretoras, permitiu a expressão não regulada de transcritos de *nifH* em condições de suficiência de amônio, maximizando a atividade da nitrogenase. Esses resultados em conjunto sugerem que a geração de estirpes excretoras de *A. brasilense* requer a falha de sinalização por glutamina, que por sua vez ocasiona o desacoplamento dos processos de fixação e assimilação de nitrogênio.

Palavras-chave: Glutamina sintetase, *Azospirillum brasilense*, fixação biológica de nitrogênio.

## ABSTRACT

Engineering naturally occurring plant-associated diazotrophs to release fixed nitrogen, such as *Azospirillum brasilense*, represents a short-term solution to the nitrogen crisis, caused by the excessive use of chemical nitrogen fertiliser in crop cultivation. However, due to its high energy cost to the cell, the nitrogen fixation and assimilation processes in this organism are highly controlled by regulatory pathways which ensure that fixed nitrogen is readily assimilated into biomass rather than being excreted to the environment. In order to mitigate these regulatory circuits, this study aimed to mutagenize the master regulator of *nif* genes transcription, NifA, through the insertion of point mutations and deletions of specific regions in its regulatory GAF domain and Q-linker, which appear to be important for the inactive protein complex formation in response to ammonium levels. Additionally, in order to relieve the post-translational regulation of the nitrogenase complex under high levels of ammonium, the *draT* gene was also deleted, which encodes the ADP-ribosyltransferase dinitrogenase reductase enzyme, responsible for modifying the NifH protein through the addition of an ADP-ribosyl group, leading to its inactivation. Similarly, the glutamine synthetase (GS) enzyme involved in ammonium assimilation pathways was altered through the insertion of the point mutation P347L, and the bifunctional post-translational modification proteins GlnE and GlnD, responsible for integrating metabolic signals that lead to GS activity shutdown through the adenylation of its monomers, were modified by the deletion of the N-terminal adenylyl-removing domain of GlnE and the introduction of inactivating substitutions in the uridylyl-removing domain of GlnD. The results showed that altering the glutamine signaling cascade by modifying the AR and UR activities of GlnE and GlnD, respectively, or by adding the P347L substitution to GS, allowed the detection of constitutive nitrogenase activity and excretion of millimolar levels of ammonium. Furthermore, the incorporation of point mutations in NifA generated variants less responsive to nitrogen and/or PII availability, and, when inserted into the genome of ammonium-excreting strains, yielded unregulated expression of *nifH* transcripts under non-nitrogen fixing conditions, maximizing the nitrogenase activity. These results taken together suggest that the construction of *A. brasilense* excretory strains requires failure of glutamine signaling, which in turn causes the uncoupling of the nitrogen fixation and assimilation processes.

Keywords: Glutamine synthetase, *Azospirillum brasilense*, biological nitrogen fixation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos componentes do complexo da nitrogenase .....	24
<b>Figura 2</b> - Mecanismo simplificado de ativação de N <sub>2</sub> para a formação de NH <sub>3</sub> .....	25
<b>Figura 3</b> - Representação estrutural da enzima glutamina sintetase bacteriana .....	28
<b>Figura 4</b> - Representação estrutural do trímero de GlnZ de <i>A. brasilense</i> .....	32
<b>Figura 5</b> - Regulação da transcrição de genes relacionados à assimilação de amônio por NtrB-NtrC.....	37
<b>Figura 6</b> - Modelo de regulação da atividade de GS em resposta à concentração de amônio	41
<b>Figura 7</b> - Modelo estrutural esquemático dos domínios funcionais da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> .....	43
<b>Figura 8</b> - Regulação do complexo da nitrogenase por DraT e DraG via interação com PII e AmtB em resposta a amônio .....	47
<b>Figura 9</b> - Alinhamento parcial de proteínas NifA destacando os resíduos alvos de mutagenese neste estudo .....	97
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática da estratégia utilizada para obtenção de variantes pontuais de NifA expressas a partir de pPR34.....	99
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática da estratégia utilizada para obtenção de variantes pontuais de NifA expressas a partir de pET28a .....	101
<b>Figura 12</b> - Representação esquemática da construção de vetores expressando NifA truncada em parte do Q-linker .....	103
<b>Figura 13</b> - Atividade de β-galactosidase em culturas de <i>E. coli</i> ET8000 expressando variantes de <i>AbNifA</i> .....	104
<b>Figura 14</b> - Atividade de β-galactosidase em culturas de <i>E. coli</i> JM109 expressando NifA truncada de <i>A. brasilense</i> sob indução com diferentes concentrações de IPTG .....	106
<b>Figura 15</b> - Atividade de β-galactosidase em culturas de <i>E. coli</i> JM109 expressando variantes de NifA de <i>A. brasilense</i> sob indução com IPTG .....	107
<b>Figura 16</b> - Representação esquemática da construção de plasmídeos para expressão de variantes de NifA em <i>A. brasilense</i> .....	110
<b>Figura 17</b> - Atividade de nitrogenase da estirpe mutante FP2Δ <i>nifA</i> complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA.....	111
<b>Figura 18</b> - Atividade de nitrogenase da estirpe mutante 7628 complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA.....	115
<b>Figura 19</b> - Atividade de nitrogenase da estirpe mutante 2812 complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA.....	117

<b>Figura 20</b> - Representação esquemática da construção de plasmídeos mutagênicos para deleção do gene <i>nifA</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	120
<b>Figura 21</b> - Construção de plasmídeos mutagênicos para a inserção de mutações pontuais de NifA no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	122
<b>Figura 22</b> - Determinação de atividade da nitrogenase de estirpes mutantes contendo mutações pontuais de NifA .....	124
<b>Figura 23</b> - Representação esquemática da construção de plasmídeo mutagênico para deleção da porção 5' de <i>nifA</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	126
<b>Figura 24</b> - Modelo estrutural esquemático da porção deletada da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> .....	127
<b>Figura 25</b> - Modelo estrutural dos resíduos 1-465 de <i>AbNifA</i> .....	129
<b>Figura 26</b> - Comparação entre modelos gerados para 1-203, 1-465, e 1-625 de <i>AbNifA</i> .....	131
<b>Figura 27</b> - Localização das mutações neutras e ativadoras no modelo de <i>AbNifA</i> .....	133
<b>Figura 28</b> - Comparação de modelos estruturais de <i>AbNifA</i> contendo diferentes substituições .....	135
<b>Figura 29</b> - Comparação de modelos estruturais de <i>AbNifA</i> contendo diferentes substituições (2) .....	137
<b>Figura 30</b> - Comparação de modelos estruturais de <i>AbNifA</i> contendo diferentes substituições (3) .....	138
<b>Figura 31</b> - Representação esquemática da construção de plasmídeo mutagênico para deleção de <i>draT</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	140
<b>Figura 32</b> - Determinação de atividade da nitrogenase de mutantes contendo mutação nos genes <i>nifA</i> e <i>draT</i> .....	141
<b>Figura 33</b> - Ensaio de <i>Switch on/off</i> da nitrogenase de mutante contendo deleção de <i>draT</i> . 143	
<b>Figura 34</b> - Representação esquemática da construção de plasmídeo mutagênico para inserção de mutação pontual de <i>glnA</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	146
<b>Figura 35</b> - Determinação de atividade da nitrogenase do mutante <i>glnAP347L</i> cultivado em diferentes concentrações de amônio.....	148
<b>Figura 36</b> - Ensaio de quantificação de amônio excretado pela estirpe <i>glnAP347L</i> .....	149
<b>Figura 37</b> - Perfil de crescimento do mutante <i>glnAP347L</i> relativo à estirpe selvagem FP2 de <i>A. brasilense</i> .....	150
<b>Figura 38</b> - Efeito da adição de diferentes concentrações de glutamina no perfil de crescimento do mutante <i>glnAP347L</i> .....	151
<b>Figura 39</b> - Titulação de oxigênio da atmosfera gasosa de frascos para ARA em meio líquido .....	152

<b>Figura 40</b> - Avaliação dos níveis de expressão de <i>nifA</i> a partir da estirpe <i>glnAP347L</i> cultivada na ausência ou presença de amônio.....	153
<b>Figura 41</b> - Determinação de atividade da nitrogenase dos mutantes duplos de GS e NifA em condições de baixos e altos níveis de amônio .....	155
<b>Figura 42</b> - Avaliação dos níveis de expressão de <i>nifH</i> nos mutantes duplos de GS e NifA cultivados na ausência ou presença de amônio .....	156
<b>Figura 43</b> - Perfil de crescimento dos mutantes duplos de GS e NifA relativo às estirpes FP2 e <i>glnAP347L</i> de <i>A. brasilense</i> .....	157
<b>Figura 44</b> - Efeito da adição de glutamina no perfil de crescimento dos mutantes duplos de GS e NifA .....	159
<b>Figura 45</b> - Ensaio de quantificação de amônio excretado pelos mutantes duplos de GS e NifA .....	160
<b>Figura 46</b> - Construção de plasmídeo mutagênico para a truncagem da porção 5' de <i>glnE</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	162
<b>Figura 47</b> - Determinação de atividade da nitrogenase das estirpes mutantes de GlnE e GlnD .....	165
<b>Figura 48</b> - Ensaio de quantificação de amônio excretado pelo mutante FP2 $\Delta$ <i>NglnEglnD</i> * .....	166
<b>Figura 49</b> - Perfil de crescimento do mutante FP2 $\Delta$ <i>NglnEglnD</i> * relativo às estirpes FP2 e <i>glnAP347L</i> .....	168
<b>Figura 50</b> - Efeito da adição de glutamina no perfil de crescimento do mutante FP2 $\Delta$ <i>NglnEglnD</i> * .....	169
<b>Figura 51</b> - Avaliação dos níveis de expressão de <i>nifA</i> a partir da estirpe FP2 $\Delta$ <i>NglnEglnD</i> * cultivada na ausência ou presença de amônio.....	170
<b>Figura 52</b> - Perfil de atividade da nitrogenase do mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA em condições de baixo e alto amônio .....	172
<b>Figura 53</b> - Avaliação dos níveis de expressão de <i>nifH</i> no mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA cultivado na ausência ou presença de amônio.....	173
<b>Figura 54</b> - Perfil de crescimento do mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA relativo às estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ <i>NglnEglnD</i> * .....	174
<b>Figura 55</b> - Ensaio de quantificação de amônio excretado pelo mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA.....	175
<b>Figura 56</b> - Expressão e perfil de modificação pós-traducional de GS, GlnB e GlnZ nas estirpes selvagem e mutantes de GlnA de <i>A. brasilense</i> .....	181
<b>Figura 57</b> - Expressão e perfil de modificação pós-traducional de GS, GlnB e GlnZ nas estirpes selvagem e mutantes de GlnE e GlnD de <i>A. brasilense</i> .....	183

<b>Figura 58</b> - Alinhamento total das proteínas GS e PuvA de <i>A. brasilense</i> .....	187
<b>Figura 59</b> - Análise da especificidade do anticorpo anti-GS de <i>A. brasilense</i> .....	188
<b>Figura 60</b> - Perfil de proteínas do extrato das estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ NgnEglnD* cultivadas em alto nitrogênio .....	189
<b>Figura 61</b> - Cromatografia em camada delgada com padrões de glutamina, glutamato e alanina .....	193
<b>Figura 62</b> - Cromatografia em camada delgada com o sobrenadante de culturas de estirpes excretoras de amônio.....	194

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estirpes de bactérias utilizadas.....	54
<b>Tabela 2</b> - Plasmídeos utilizados .....	56
<b>Tabela 3</b> - Concentrações de antibióticos utilizados nos cultivos .....	64
<b>Tabela 4</b> - Composição do meio Nfb.....	64
<b>Tabela 5</b> - Composição do meio LB.....	65
<b>Tabela 6</b> - Composição do meio L .....	66
<b>Tabela 7</b> - Composição do meio SOC .....	66
<b>Tabela 8</b> - Composição do meio NFDM .....	66
<b>Tabela 9</b> - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.....	69
<b>Tabela 10</b> - Preparo de amostras de sequenciamento.....	76
<b>Tabela 11</b> - Composição de géis SDS-PAGE .....	86
<b>Tabela 12</b> - Composição de gel Native-PAGE.....	86
<b>Tabela 13</b> - Atividade transferásica da GS de estirpes mutantes de <i>A. brasilense</i> .....	177
<b>Tabela 14</b> - Comparação entre as massas preditas e encontradas de fragmentos de GS obtidos por análise de MALDI-TOF .....	191

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAA<sup>+</sup> – Família de ATPases associadas a diversas atividades celulares
- ACT – Domínio proteico associado a aspartato quinase, corismato mutase e TyrA
- ADP – Adenosina difosfato
- AMP – Adenosina monofosfato
- Amp<sup>R</sup> – Resistência a ampicilina
- AR – Domínio proteico removedor de grupo adenilil
- AT – Domínio proteico transferidor de grupo adenilil
- ATase/AR – Adenilil-transferase/adenilil-removase
- ATP – Adenosina trifosfato
- BSA – Albumina sérica bovina
- cAMP – Adenosina monofosfato cíclico
- Cb<sup>R</sup> – Carbenicilina
- CDS – *Coding sequence of a gene*
- Cm<sup>R</sup> – Resistência a cloranfenicol
- CRP – Proteína receptora de cAMP
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – Desoxinucleotídeos trifosfatos (mistura equimolar de dATP, dTTP, dGTP e dCTP)
- DO<sub>600nm</sub> – Densidade ótica medida em comprimento de onda de 600 nm
- DraG – Dinitrogenase redutase glicohidrolase
- DraT – Dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase
- DTT – Ditiotreitól
- EBPs – Família de proteínas ativadoras de transcrição (*enhancer binding proteins*)
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EDA – Etilenodiamina
- FAD – Flavina-adenina-dinucleotídeo
- FBN – Fixação biológica do nitrogênio
- FMN – Flavina mononucleotídeo
- GAF – Domínio proteico associado a fosfodiesterases cGMP-específicas, adenilil ciclases e FhlA
- GDH – Glutamato desidrogenase
- GOGAT – Glutamato sintase
- GS – Glutamina sintetase
- GST – Atividade transferásica da glutamina sintetase

HD – Domínio proteico fosfohidrolase contendo resíduos conservados de histidina e aspartato  
IDT – Integrated DNA Technologies  
IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo  
Kb – *kilobase*  
Kcal – quilocaloria  
kDa – kiloDaltons  
 $K_m$  – Constante de Michaelis-Menten  
 $K_m^R$  – Resistência a canamicina  
KLD – Mistura comercial das enzimas quinase, ligase e DpnI  
LA – Meio de cultivo *Lysogeny agar*  
LB – Meio de cultivo *Lysogeny broth*  
LGH –  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato  
LPSN – *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*  
MCS – Sítio de policlonagem  
 $NAD^+$  – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado  
 $NADP^+$  – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
 $N_2$ ase – Nitrogenase  
 $Nal^R$  – Resistência a ácido nalidíxico  
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*  
NEB – New England Biolabs  
NFDM – *NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free Davis minimal medium*  
NFN – Núcleo de fixação de nitrogênio  
NT – Domínio proteico nucleotidiltransferase  
2-OG – 2-oxoglutarato  
ONPG – Orto-nitrofenil- $\beta$ -galactosídeo  
ORF – *Open reading frame*  
pb – Pares de bases  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PPi – Pirofosfato  
QL – Q-linker - região entre domínios  
RNA – Ácido ribonucleico  
rpm – Rotações por minuto  
RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa  
 $Sm^R$  – Resistência a estreptomicina

SOC – *Super optimal broth with carbohydrate*

Tc<sup>R</sup> – Resistência a tetraciclina

Td – Tempo de duplicação

TI – Tempo de fase lag

UAS – *Upstream activator sequence*

UMP – Uridina monofosfato

UR – Domínio proteico removedor de grupo uridilil

UT – Domínio proteico transferidor de grupo uridilil

UTase/UR – Uridilil-transferase/uridilil-removase

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
1.1	Crescimento populacional e a crise do nitrogênio .....	20
1.2	Gênero <i>Azospirillum</i> .....	21
1.3	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) .....	23
1.4	Assimilação de amônio .....	25
1.4.1	Glutamina sintetase (GS) .....	27
1.4.2	Regulação da assimilação de amônio .....	29
1.5	Regulação transcricional da FBN mediada por NifA .....	41
1.5.1	Estrutura e função dos domínios de NifA .....	42
1.5.2	Modulação da atividade de NifA em organismos diazotróficos .....	43
1.6	Regulação pós-traducional da nitrogenase .....	46
1.7	Manipulação de organismos diazotróficos para excreção de amônio .....	48
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
3.1	Objetivo geral .....	53
3.2	Objetivos específicos .....	53
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
4.1	Bactérias e Plasmídeos .....	54
4.2	Antibióticos .....	63
4.3	Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias .....	64
4.3.1	Meios empregados para cultivo de <i>A. brasilense</i> .....	64
4.3.2	Meios empregados para cultivo de <i>E. coli</i> .....	65
4.3.3	Estoque de linhagens de bactérias .....	67
4.3.4	Cultivo de <i>A. brasilense</i> para registro de curvas de crescimento .....	67
4.4	Métodos <i>in silico</i> .....	68
4.4.1	Alinhamento de sequências de DNA e proteína .....	68
4.4.2	Desenho de oligonucleotídeos .....	68
4.4.3	Análise estatística .....	70
4.4.4	Modelagem estrutural e visualização de estruturas de proteínas .....	71
4.5	Técnicas de manipulação de DNA .....	71
4.5.1	Purificação de DNA genômico de <i>A. brasilense</i> .....	71
4.5.2	Extração plasmidial .....	71
4.5.3	Eletroforese de DNA/RNA em gel de agarose .....	72

4.5.4	Quantificação e avaliação da pureza de DNA/RNA .....	73
4.5.5	Amplificação de DNA .....	73
4.5.6	Clivagem de DNA com enzimas de restrição .....	74
4.5.7	Purificação de fragmentos de DNA .....	74
4.5.8	Ligação de fragmentos de DNA aos vetores .....	75
4.5.9	Mutagênese sítio-dirigida .....	75
4.5.10	Sequenciamento de DNA .....	76
4.6	Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	77
4.6.1	Condições de crescimento de estirpes para extração de RNA .....	77
4.6.2	Purificação de RNA .....	78
4.6.3	Reação de PCR quantitativa (qPCR) .....	79
4.7	Transformação bacteriana .....	79
4.7.1	Preparo de células quimiocompetentes utilizando MgCl <sub>2</sub> e CaCl <sub>2</sub> .....	79
4.7.2	Transformação bacteriana por choque térmico .....	80
4.8	Conjugação bacteriana biparental .....	80
4.9	Estratégia para obtenção de mutantes cromossomais de <i>A. brasilense</i> .....	81
4.9.1	Construção de mutantes contendo deleção total ou parcial de genes .....	81
4.9.2	Construção de mutantes contendo mutação pontual de genes .....	83
4.10	Manipulação de proteínas .....	85
4.10.1	Dosagem de proteínas totais .....	85
4.10.2	Eletroforese de proteínas .....	85
4.10.3	<i>Western-blotting</i> .....	87
4.10.4	Análise de proteínas por MALDI-TOF .....	88
4.11	Ensaio de atividade enzimática .....	89
4.11.1	Determinação de atividade da nitrogenase em <i>A. brasilense</i> .....	89
4.11.2	Ensaio de <i>switch on/off</i> da nitrogenase .....	90
4.11.3	Determinação de atividade da glutamina sintetase (GS) .....	90
4.11.4	Determinação de atividade da β-galactosidase em <i>E. coli</i> .....	92
4.12	Quantificação de amônio excretado em culturas .....	94
4.13	Cromatografia em camada delgada para identificação de aminoácidos .....	94
4.13.1	Preparo de amostras .....	94
4.13.2	Cromatografia e revelação de sílica .....	95
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
5.1	Avaliação do efeito da mutagênese de NifA em <i>E. coli</i> .....	96
5.1.1	Construção de plasmídeos para expressão de variantes de NifA em <i>E. coli</i> .....	97

5.1.2	Avaliação da ativação de uma fusão transcricional por variantes de NifA em <i>E. coli</i> ET8000.....	104
5.1.3	Avaliação da ativação de uma fusão <i>nifH:lacZ</i> por variantes de NifA em <i>E. coli</i> JM109.....	105
5.2	Avaliação do efeito da mutagênese de NifA em <i>A. brasilense</i> .....	109
5.2.1	Construção de plasmídeos para expressão de variantes de NifA em <i>A. brasilense</i> ...	109
5.2.2	Complementação de estirpe mutante <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> .....	110
5.2.3	Complementação de mutantes PII de <i>A. brasilense</i> .....	113
5.2.4	Construção de mutantes cromossômicos de NifA de <i>A. brasilense</i> .....	118
5.2.5	Modelagem estrutural de <i>AbNifA</i> .....	128
5.3	Avaliação do efeito da mutagênese de <i>DraT</i> em <i>A. brasilense</i> .....	139
5.3.1	Construção de plasmídeo mutagênico para deleção de <i>draT</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	139
5.3.2	Construção de mutantes contendo deleção do gene <i>draT</i> no genoma.....	140
5.3.3	Caracterização de estirpes contendo mutagênese de <i>DraT</i> .....	141
5.4	Avaliação do efeito de mutação de GS em <i>A. brasilense</i> .....	144
5.4.1	Construção do plasmídeo mutagênico para inserção de mutação pontual de <i>glnA</i> no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	146
5.4.2	Construção de mutante contendo mutação pontual de <i>glnA</i> inserida no genoma .....	147
5.4.3	Caracterização de mutante contendo mutação pontual em GS .....	147
5.5	Avaliação do efeito da adição de mutações ativadoras de NifA no mutante <i>glnAP347L</i> .....	153
5.5.1	Construção das estirpes mutantes duplas nos genes <i>glnA</i> e <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> .....	154
5.5.2	Caracterização de mutantes contendo mutações pontuais em GS e NifA .....	154
5.6	Avaliação do efeito da mutagênese de GlnE e GlnD em <i>A. brasilense</i> .....	161
5.6.1	Construção de plasmídeo mutagênico para a deleção da porção 5' de <i>glnE</i> .....	161
5.6.2	Construção de mutante contendo deleção da região 5' de <i>glnE</i> no genoma .....	163
5.6.3	Construção de plasmídeo mutagênico para inserção de mutações pontuais em <i>glnD</i> 163	
5.6.4	Construção de mutantes contendo mutações pontuais em <i>glnD</i> no genoma.....	164
5.6.5	Caracterização de mutantes contendo mutagênese de GlnE e/ou GlnD.....	164
5.7	Avaliação do efeito da adição de mutações ativadoras de NifA no mutante <i>FP2ΔNglNEglnD*</i> .....	171
5.7.1	Construção da estirpe mutante tripla contendo mutação nos genes <i>glnE</i> , <i>glnD</i> e <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> .....	171
5.7.2	Caracterização de mutante triplo contendo mutagênese de GlnE, GlnD e NifA .....	171

5.8	Avaliação de atividade da glutamina sintetase (GS) dos mutantes construídos.....	176
5.9	Avaliação da expressão e estado de modificação pós-traducional de GS e PII nos mutantes construídos.....	180
5.10	Estudo da glutamina sintetase do mutante FP2 $\Delta$ NglN <i>EglnD</i> * .....	186
5.10.1	Busca de proteínas homólogas de GS no genoma de <i>A. brasilense</i> .....	186
5.10.2	Identificação de GS por MALDI-TOF/MS .....	189
5.11	Avaliação da capacidade dos mutantes de excretar outros compostos aminados ...	193
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>195</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>196</b>

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Crescimento populacional e a crise do nitrogênio

O elemento nitrogênio é um dos nutrientes limitantes para o desenvolvimento de plantas (LEBAUER e TRESEDER, 2008). Com a elucidação do processo de Haber-Bosch e a síntese industrial de fertilizantes nitrogenados, houve um aumento massivo do crescimento populacional global no último século (SMIL, 2002; ERISMAN *et al.*, 2008). Em 2050, é estimado que a população do planeta atinja a marcar de 10 bilhões de pessoas, o que exigirá um aumento superior a 50% na produção agrícola, equivalente a um salto de 13.100 trilhões de quilocalorias (kcal) por ano em 2010 para 20.500 trilhões de kcal em 2050 (SEARCHINGER *et al.*, 2019). Entretanto, as tendências de rendimento na produtividade de safras globais importantes como milho, arroz, trigo e soja, não tem acompanhado as demandas projetadas para esse ano (RAY *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o uso de fertilizantes químicos nas lavouras, especialmente os nitrogenados, acarretam em uma série de prejuízos para o meio ambiente e a saúde humana. Isso pois, somente cerca de metade do total aplicado é eficientemente utilizado pela planta, e o excesso resultante leva a contaminação de água potável e alimenta a proliferação de algas nocivas (STOKSTAD, 2016). Além disso, diversos estudos têm apontado a correlação direta entre o uso excessivo de fertilizantes nitrogenados e o aumento da liberação de gases de efeito estufa na atmosfera, acidificação do solo, e perda da biodiversidade, entre outros problemas (ERISMAN *et al.*, 2011, GALLOWAY *et al.*, 2003).

Neste cenário, o aumento da eficiência global do uso do nitrogênio representa uma meta essencial no sentido de intensificar a agricultura de forma sustentável. Uma das alternativas para atingir esse objetivo corresponde à promoção da fixação biológica de nitrogênio (FBN) diretamente em plantas através de duas formas: desenvolvimento de associações simbióticas em cereais, através do sensoriamento/associação com bactérias fixadoras de nitrogênio e formação de nódulos; ou da transferência da maquinaria da FBN para organelas vegetais, como cloroplasto e mitocôndrias, dispensando a necessidade de interação com bactérias (STOKSTAD, 2016; BUREN e RUBIO, 2018; BLOCH *et al.*, 2020a). Apesar dos crescentes avanços nos últimos anos, essas duas abordagens envolvem o uso de estratégias de biologia sintética complexas, dada a dificuldade de compatibilização do metabolismo e genética de plantas com os componentes da fixação de nitrogênio bacterianos. Por esse motivo, é provável que essas tecnologias sejam soluções apenas a longo prazo para a crise do nitrogênio.

Uma segunda abordagem para o aumento sustentável da produção agrícola é centrada no melhoramento da eficácia de colonização e liberação do nitrogênio fixado por bactérias diazotróficas encontradas naturalmente associadas a cereais de interesse agrícola (STOKSTAD, 2016; BUREN e RUBIO, 2018; BLOCH *et al.*, 2020a). A capacidade de fixação de nitrogênio tem sido relatada em uma ampla gama de gêneros bacterianos, muitos dos quais são conhecidos por serem rizobactérias associativas (residindo na superfície ou proximidade da raiz) e endofíticas (residindo dentro das células vegetais), incluindo *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (SANTI, BOGUSZ e FRANCHE, 2013). O uso desses organismos apresenta a vantagem de não envolver a modificação genética de plantas, o que é particularmente interessante em países onde o acesso a plantas transgênicas é restrito ou proibido. Portanto, o uso de bactérias diazotróficas como biofertilizantes representa uma solução mais sustentável e de curto prazo à fertilização química.

## 1.2 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* ( $\alpha$ -Proteobacteria, Rhodospirillaceae), inicialmente descrito por Tarrand e colaboradores (1978), compreende bactérias diazotróficas, aeróbicas, gram-negativas, móveis e endofíticas facultativas. De acordo com a *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN) (EUZEBY, 1997; PARTE *et al.*, 2020), esse gênero atualmente comporta 24 espécies: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *Azospirillum halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *Azospirillum amazonense* (MAGALHAES *et al.*, 1983), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *Azospirillum largimobile* (DEKHIL *et al.*, 1997), *Azospirillum doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001) e *Azospirillum oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *Azospirillum melinis* (PENG *et al.*, 2006), *Azospirillum canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007), *Azospirillum zea* (MEHNAZ *et al.*, 2007), *Azospirillum rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *Azospirillum picis* (LIN *et al.*, 2009), *Azospirillum thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010), *Azospirillum formosense* (LIN *et al.*, 2012), *Azospirillum fermentarium* (LIN *et al.*, 2013), *Azospirillum humicireducens* (ZHOU *et al.*, 2013), *Azospirillum soli* (LIN *et al.*, 2015), *Azospirillum agricola* (LIN *et al.*, 2016), *Azospirillum griseum* (YANG *et al.*, 2019), *Azospirillum palustre* (TIKHONOVA *et al.*, 2019), *Azospirillum ramasamyi* (ANANDHAM *et al.*, 2019), *Azospirillum baldaniorum* (FERREIRA *et al.*, 2020) e *Azospirillum thermophilum* (ZHAO *et al.*, 2020).

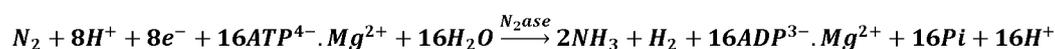
Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum*, a espécie *Azospirillum brasilense* tem sido amplamente estudada devido a sua ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais e por ser capaz de promover o crescimento vegetal, aumentando o rendimento de

safras de importância agrônômica (DOBBELAERE *et al.*, 2001). Estudos de avaliação do efeito da inoculação de estirpes de *A. brasilense* em campo desenvolvidos por Hungria e colaboradores (2010) mostraram aumento de produtividade de cultivares de milho e trigo em 27% e 31%, respectivamente, confirmando o potencial desse organismo como biofertilizante. Esse efeito tem sido atribuído principalmente à produção fitohormônios promotores do crescimento vegetal (SPAEPEN *et al.*, 2008, CASSAN *et al.*, 2011) ao invés da FBN, já que a transferência do nitrogênio fixado para as plantas ocorre de forma lenta e indireta, presumivelmente exigindo decomposição e mineralização bacteriana (OKON *et al.*, 1983; CHRISTIANSEN-WENIGER e VAN VEEN, 1991; WOOD *et al.*, 2001).

O efeito positivo da FBN de *A. brasilense* sobre o crescimento vegetal motivou a busca por estirpes que fossem mais eficientes na fixação de nitrogênio e/ou na transferência do nitrogênio fixado para a planta, já que os processos de fixação e assimilação de nitrogênio são fortemente acoplados e bactérias diazotróficas não liberam altruisticamente altas taxas de amônio para o ambiente (BATISTA e DIXON, 2019). Com isto em mente, Machado e colaboradores (1988) isolaram quatro mutantes resistentes a etilenodiamina (EDA) a partir da estirpe Sp7 de *A. brasilense*, os quais mostraram ser capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio. Os resultados obtidos desde então para o efeito da excreção de nitrogênio sobre o crescimento vegetal têm sido animadores: espécimes de *Setaria viridis* quando inoculadas com um desses mutantes, a estirpe HM053, assimilaram nitrogênio a uma taxa até dezesseis vezes maior em relação a plantas inoculadas com a estirpe selvagem FP2, sendo essa quantidade suficiente para atender a demanda de nitrogênio diária pela planta (PANKIEVICZ *et al.*, 2015). Além disso, quando inoculada em plântulas de trigo, a estirpe HM053 mostrou ser capaz de colonizar a superfície da raiz e aumentar o peso seco da parte aérea e raiz em 30 e 49%, respectivamente, quando comparada ao controle não inoculado; e 30 e 31% em relação à estirpe parental FP2, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2017). Estudos em campo conduzidos por Pedrosa e colaboradores (2019) mostraram ainda que a inoculação de plântulas de milho com a estirpe HM053 (a partir de fertilização base de 30 kg N/ha) aumentou o rendimento de produtividade entre 4,7-29% (ou 460,5-1769,3 kg/ha) comparado ao controle não inoculado, enquanto o aumento resultante da inoculação com a estirpe não excretora de amônio Ab-V5 variou entre 2,2-10,4% (ou 178,0-759,9 kg/ha). Esse fenótipo característico da estirpe HM053 tem sido atribuído a uma mutação pontual no gene *glnA* situada na posição 1040, a qual leva à substituição de um nucleotídeo citosina por timina e consequente substituição de um resíduo de prolina por leucina na posição 347 (P347L) da glutamina sintetase (HAUER, 2012), reduzindo sua atividade. Entretanto, pelo modo como o mutante foi obtido, não é sabido se haveria mutações em outros genes que poderiam contribuir para esse fenótipo.

### 1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

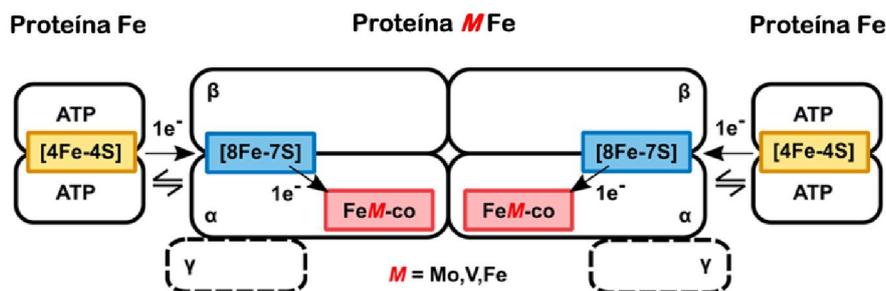
A redução de  $N_2$  a  $NH_3$  que ocorre durante a FBN é uma reação com múltiplas etapas catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (SIMPSON e BURRIS, 1984). Este processo requer grande quantidade de energia obtida por hidrólise de MgATP a MgADP + Pi, como representado pela seguinte reação (IPATA e PESI, 2015):



Nitrogenases são metaloenzimas sensíveis a oxigênio com estrutura e mecanismos de catálise conservados, formadas pela interação entre duas enzimas distintas: a dinitrogenase, que efetivamente realiza transferência de elétrons para a molécula de dinitrogênio a amônio, e a dinitrogenase redutase, que recebe elétrons de ferredoxinas e os transfere para a dinitrogenase. Atualmente, sabe-se da existência de três isozimas possíveis do complexo da nitrogenase, todas as quais possuem grande similaridade de sequência e função de seus componentes, mas que são distinguidas pelo uso de diferentes cofatores metálicos no sítio ativo da dinitrogenase; elas são conhecidas como nitrogenases dependentes de molibdênio (Mo), vanádio (V) ou ferro (Fe) (HARRIS *et al.*, 2018), as quais são codificadas por *clusters* de genes exclusivos denominados *nif*, *vnf* e *anf*, respectivamente (EADY, 1996). Sua distribuição é restrita a procariotos, mas entre eles, ocorre em diversas linhagens evolutivas pouco relacionadas (SANTOS *et al.*, 2012).

A forma mais amplamente distribuída é a nitrogenase dependente de molibdênio (Mo), mais bem caracterizada em *Azotobacter vinelandii*. Como todas as nitrogenases, ela possui dois componentes funcionais: o primeiro componente, denominado dinitrogenase redutase (proteína ferro, Fe ou NifH), é um homodímero  $c_2$  de 64 kDa que contém um cluster único [4Fe-4S] na interface entre as duas subunidades e dois sítios de ligação a MgATP (GEORGIADIS *et al.*, 1992). Por sua vez, o componente catalítico, denominado dinitrogenase (proteína ferro-molibdênio, FeMo ou NifDK), é um heterotetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  de 250 kDa que recebe elétrons oriundos da dinitrogenase redutase e catalisa a redução do dinitrogênio a amônia. Cada heterodímero  $\alpha\beta$  contém um cluster P [8Fe-7S] na interface entre as subunidades e um cofator de sítio ativo de homocitrato FeMoco [7Fe-9S-C-Mo-homocitrato] na subunidade  $\alpha$ , sendo este último o sítio para redução de substrato (LANCASTER *et al.*, 2011) (Figura 1).

**Figura 1 - Representação esquemática dos componentes do complexo da nitrogenase**



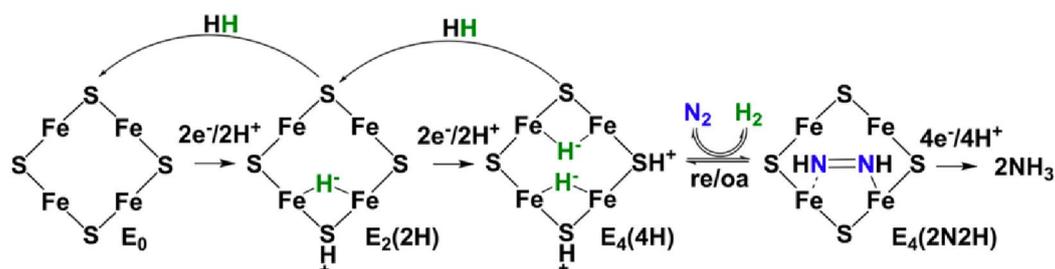
O componente doador de elétrons do complexo da nitrogenase, conhecido como dinitrogenase redutase ou proteína Fe, é um homodímero que contém um cluster único [4Fe-4S] (mostrado em amarelo) e dois sítios de ligação a ATP (um em cada monômero). O componente catalítico, mais comumente conhecido como dinitrogenase ou proteína FeMo, é um heterotetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  que possui um cluster P [8Fe-7S] (mostrado em azul) e um cofator FeMoco [7Fe-9S-C-Mo-homocitrato] (mostrado em vermelho). O fluxo de elétrons provém do cluster [4Fe-4S] para o cluster P, chegando ao cofator FeMoco. Apesar da isozima dependente de molibdênio ser a predominante, alguns organismos diazotróficos carregam genes para as isozimas ferro-vanádio (FeV) ou ferro-ferro (FeFe), as quais são heterohexâmeros  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  que contém os metais vanádio e ferro (representados pela letra M), respectivamente. Adaptado de HARRIS *et al.*, 2018.

Durante a catálise, a proteína Fe participa em um ciclo de três estados para que haja a transferência de elétrons para a proteína FeMo (SEEFELDT *et al.*, 2009). Inicialmente, a proteína Fe reduzida com o cluster [4Fe-4S] em seu estado de oxidação  $1^+$  liga-se a duas moléculas de MgATP, formando o complexo  $\text{Fe}^{\text{red}}(\text{ATP})_2$ . Em seguida, há a associação temporária com a proteína FeMo, o que permite a transferência de um elétron do cluster [4Fe-4S] até o cofator FeMoco da proteína FeMo, produzindo  $[\text{Fe}^{\text{ox}}(\text{ATP})_2:\text{MoFe}^{\text{red}}]$ . Durante esse processo, há a hidrólise das moléculas de MgATP, e os dois Pi produzidos dissociam-se do sítio de ligação, permitindo o relaxamento do complexo conformacional ativo. Uma vez oxidada e com o cluster [4Fe-4S] em seu estado de oxidação  $2^+$ , a proteína Fe dissocia-se da proteína FeMo, gerando  $[\text{Fe}^{\text{ox}}(\text{ADP})_2]$ , e é regenerada através da ligação a novas moléculas de MgATP e a redução do  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$  para o estado de oxidação  $1^+$  (SEEFELDT *et al.*, 2009, DUVAL *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo a proteína FeMo complexada durante a catálise têm esclarecido como elétrons e prótons acumulam-se no cofator FeMoco e como a enzima é ativada para ligação e redução do  $\text{N}_2$  em nove etapas (representadas por E<sub>0</sub>-E<sub>8</sub>) (HOFFMAN *et al.*, 2014). De forma geral, nas etapas iniciais (E<sub>0</sub>-E<sub>4</sub>), quatro elétrons e quatro prótons são acumulados no cofator FeMoco para criar o estado E<sub>4</sub>(4H), no qual dois hidretos são coordenados em forma de ponte por átomos de ferro compartilhados (Fe-H-Fe). Os dois hidretos são então combinados para formar  $\text{H}_2$  em uma reação de eliminação redutiva, a qual é acoplada com a ligação e redução de  $\text{N}_2$  por dois elétrons e prótons para formar o complexo intermediário metálico de

diazeno ( $E_4(2N_2H)$ ). Esse passo é reversível, podendo haver a adição oxidativa de  $H_2$  pelo complexo  $E_4(2N_2H)$ , levando à liberação de  $N_2$  (Figura 2) (HARRIS *et al.*, 2018, SEEFELDT *et al.*, 2020). Nas etapas subsequentes, o intermediário diazeno é reduzido a hidrazina ( $E_4(2N_4H)$ ), e então a duas moléculas de amônia (SEEFELFT *et al.*, 2013).

**Figura 2 - Mecanismo simplificado de ativação de  $N_2$  para a formação de  $NH_3$**



Na figura é mostrado o ângulo do cofator FeMoco referente aos átomos 2, 3, 6 e 7 de ferro. Nas etapas iniciais da catálise envolvendo a proteína FeMo ( $E_0$ - $E_4$ ), há o acúmulo de quatro elétrons e prótons no cofator FeMoco, formando o estado  $E_4(4H)$ , onde dois hidretos são coordenados por átomos de ferro compartilhados. Em seguida, há a formação de  $H_2$  acoplada à ligação e redução de  $N_2$  (reação direta). O primeiro complexo intermediário envolvendo nitrogênio formado,  $E_4(2N_2H)$ , é reduzido nas próximas etapas à  $E_4(2N_4H)$  e então à duas moléculas de  $NH_3$  (não mostrado). Alternativamente, o intermediário  $E_4(2N_2H)$  pode participar de uma reação reversa de adição oxidativa envolvendo a protonação de hidretos, a qual ocorre na ausência de  $N_2$  (reação reversa). Fonte: HARRIS *et al.*, 2018.

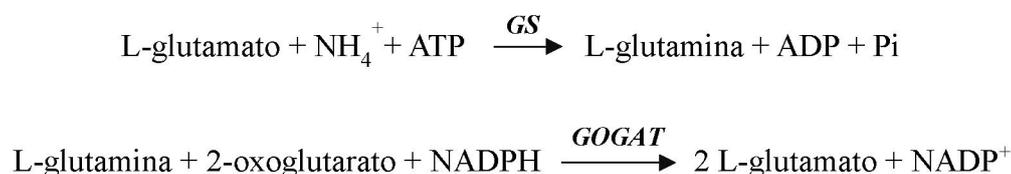
Embora os substratos fisiológicos sejam  $N_2$  e prótons, as nitrogenases também podem reduzir uma série de outros substratos, como o acetileno ( $C_2H_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), diazeno ( $N_2H_2$ ) e hidrazina ( $N_2H_4$ ). Dentre esses substratos, o acetileno, que é reduzido a etileno, é o mais comumente usado para monitorar a atividade *in vivo* e *in vitro* da nitrogenase (SEEFELFT *et al.*, 2013).

#### 1.4 Assimilação de amônio

Mediante altas concentrações de amônio no ambiente, a permeação passiva de espécies não carregadas através da membrana, como a  $NH_3$ , é normalmente suficiente para sustentar o metabolismo celular no caso de bactérias e fungos entéricos. Entretanto, em condições de fixação de nitrogênio, quando a difusão se torna limitante, sistemas de transporte de amônio ( $NH_4^+/NH_3$ ) passam a ser necessários (KLEINER, 1985, ZHENG *et al.*, 2004). Esses sistemas de captação envolvem transportadores de amônio de alta afinidade, conhecidos como Amt. Com o esclarecimento das estruturas cristalográficas do transportador AmtB de *E. coli* (ZHENG *et al.*, 2004) e Amt1 de *Archaeoglobus fulgidus* (ANDRADE *et al.*, 2005), foi demonstrado que essas proteínas são trímeros de cerca de 90 kDa, com 11 hélices transmembranas em cada monômero que formam um canal hidrofóbico, o qual possibilita a passagem de amônia em sua forma desprotonada. De acordo com mecanismo proposto, os íons

$\text{NH}_4^+$  inicialmente se ligam a um sítio localizado na entrada do canal hidrofóbico da proteína AmtB, próximo à região do periplasma celular. Em seguida, há a desprotonação facilitada por dois resíduos de histidina altamente conservados (H168 e H318). O transporte de amônia ( $\text{NH}_3$ ) então ocorre através dos poros hidrofóbicos localizados no centro de cada monômero da proteína trimérica. Após atingir o meio intracelular, a amônia passa a ser novamente protonada (ZHENG *et al.*, 2004; KHADEMI e STROUD, 2006).

Em *E. coli* e outras bactérias entéricas, o amônio captado do meio extracelular (ou obtido a partir do processo de FBN pelo complexo da nitrogenase, nas enterobactérias diazotróficas), pode ser assimilado a glutamato através de duas vias, denominadas GS-GOGAT e GDH. A via principal, GS-GOGAT, envolve a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (WESTBY *et al.*, 1987), como mostram as equações abaixo:



Na primeira reação, uma molécula de amônio é incorporada a uma molécula de glutamato para formar glutamina, em um processo dependente de ATP catalisado pela GS. Em seguida, há a transferência do grupo  $\delta$ -amino da glutamina para uma molécula de 2-oxoglutarato (2OG), produzindo duas moléculas de glutamato em uma reação dependente de NADPH e catalisada por GOGAT.

A enzima GS, codificada pelo gene *glnA* e componente central das vias de assimilação de nitrogênio, possui alta afinidade por íons amônio ( $K_{\text{NH}_4^+} = 0,1 \text{ mM}$ ,  $K_{\text{ATP}} = 0,4 \text{ mM}$ ,  $K_{\text{Glu}} = 4 \text{ mM}$ ). Por essa razão, GS é preferencialmente ativa em condições de limitação de nitrogênio (VAN HEESWIJK *et al.*, 2013) (a atividade e regulação desta enzima são discutidas com mais detalhes na seção 1.4.1).

Em *E. coli*, a enzima GOGAT (glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase), codificada pelos genes *gltB* e *gltD*, é um heterodímero formado por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de massas moleculares iguais a 166 e 52 kDa, respectivamente. A associação das subunidades leva a formação de um octâmero cataliticamente ativo contendo um cofator FAD, um cofator FMN e três diferentes clusters Fe-S, importantes para a redução de 2-oxoglutarato (VANONI e CURTI, 2008). Estudos de propriedades cinéticas revelaram que a enzima GOGAT apresenta alta afinidade aos seus substratos ( $K_{\text{Gln}} = 0,18 \text{ mM}$ ,  $K_{\text{2OG}} = 0,007 \text{ mM}$  e  $K_{\text{NADPH}} = 0,0015 \text{ mM}$ )

(RENDINA e ORME-JOHNSON, 1978). Em *A. brasilense*, os genes *gltDB* também foram descritos como codificantes para as subunidades da glutamato sintase (PELANDA *et al.*, 1993).

Alternativamente, há ainda uma segunda via de assimilação de amônio envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GDH), a qual catalisa a aminação redutiva de 2-oxoglutarato à glutamato envolvendo o gasto de uma molécula de NADPH, como representado pela equação abaixo:



Em *E. coli*, a enzima GDH, codificada pelo gene *gdhA*, é um hexâmero com massa molecular total de 275 kDa, composta por monômeros idênticos de 50 kDa (LIN e REEVES, 1991). Uma vez que a enzima não requer ATP para a catálise e devido a sua baixa afinidade de ligação aos substratos ( $K_m = 1$  mM para amônio), a via GDH encontra-se ativa em condições de excesso de amônio (SAKAMOTO *et al.*, 1975). Por outro lado, baixos níveis de nitrogênio favorecem a via GS-GOGAT, já que a enzima glutamina sintetase possui um  $K_m$  pelo menos dez vezes inferior para amônio quando comparada à glutamato desidrogenase (ALIBHAI e VILLAFRANCA, 1994). A via GS-GOGAT também é a predominante em *A. brasilense*.

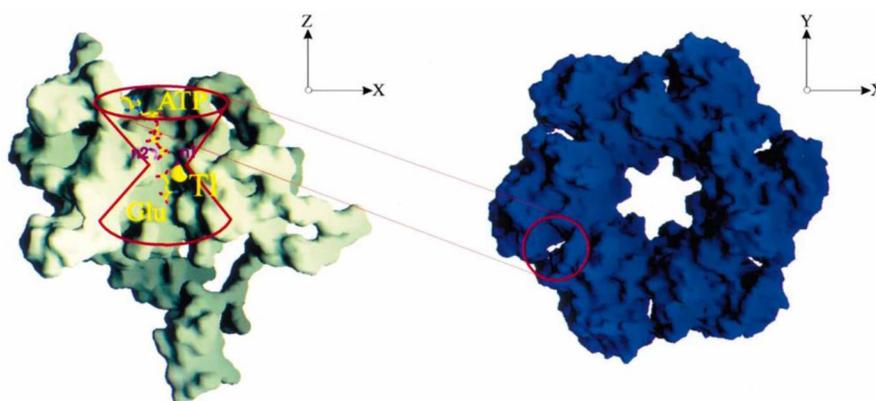
#### 1.4.1 Glutamina sintetase (GS)

Como mencionado anteriormente, a enzima GS participa na via central de assimilação de amônio e biossíntese de glutamina durante a fixação biológica de nitrogênio. Quatro tipos de glutamina sintetase são descritas na literatura: GSI, GSII, GSIII e GlnT (MERRICK e EDWARDS, 1995). A forma mais comum encontrada em procariotos, GSI, é uma enzima dodecamérica com subunidades idênticas que interagem para formar uma estrutura quaternária com a forma de dois anéis hexagonais sobrepostos, os quais são mantidos juntos por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre as subunidades (ALMASSY *et al.*, 1986). Experimentos de caracterização da enzima GS de *A. brasilense* mostraram semelhanças com a enzima de *E. coli*, sendo as massas moleculares do oligômero de 12 subunidades e de cada monômero de aproximadamente 630 e 52 kDa, respectivamente (PIROLA *et al.*, 1992).

Cada um dos doze sítios ativos, localizados na interface entre os monômeros, podem ser descritos com “bi-funis”, nos quais há a ligação de ATP e glutamato nas extremidades opostas (Figura 3). Além disso, na região central desses funis há dois sítios de ligação para cátions divalentes, conhecidos como n1 e n2, os quais são envolvidos na ligação de glutamato e transferência de grupo fosforil, respectivamente (EISENBERG *et al.*, 2000). Esses sítios

normalmente são ocupados por íons  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , os quais são importantes para a catálise enzimática. Estudos de especificidade de GS de *A. brasilense* demonstraram que as propriedades catalíticas da enzima variam de acordo com a ligação a diferentes cátions divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ), cuja afinidade é influenciada pelo estado de adenilação da enzima e pH do meio (BENDER *et al.*, 1977; ANTONYUK, 2007).

**Figura 3 - Representação estrutural da enzima glutamina sintetase bacteriana**



GS tipo I bacterianas são dodecâmeros formados a partir de dois anéis hexaméricos sobrepostos (estrutura em azul), com 12 sítios ativos formados entre os monômeros vizinhos. Cada sítio ativo pode ser visualizado como um bi-funil (representado em vermelho), com entradas na parte superior e inferior para os substratos ATP e glutamato, respectivamente (mostrados em amarelo), e com sítios de ligação para dois metais bivalentes na região de junção do funil. A estrutura em verde representa o domínio C-terminal (resíduos 101-468) de uma subunidade. A hélice C-terminal, chamada de haste helicoidal, é visível como uma extensão prolongada da estrutura na parte inferior da subunidade isolada, e é inserida em um orifício hidrofóbico na subunidade eclipsada do anel hexamérico oposto. Adicionalmente, o canal central do dodecâmero é revestido por seis folhas- $\beta$  de quatro fitas, cada uma construída a partir de um *loop* antiparalelo (resíduos 137-152) contribuído por subunidades em anéis opostos. Uma dessas alças antiparalelas é visível como uma haste dobrada (mostrada na região inferior direita da estrutura em verde), à direita da haste helicoidal C-terminal. Estrutura de *Salmonella typhimurium*, EISENBERG *et al.*, 2000.

A partir de estudos de cristalografia de raios-X de cinco complexos enzima-substrato analisados em diferentes tempos e disposições espaciais e da interpretação dos estados intermediários, foi proposto um mecanismo das etapas envolvidas na biossíntese de glutamina pela enzima GS de *Salmonella typhimurium* em seu estado totalmente desadenilado (LIAW e EISENBERG, 1994). Segundo o mecanismo de reação proposto, inicialmente uma molécula de ATP liga-se à região superior do centro ativo em formato de funil, com o grupo fosfato ligando adjacente ao cátion bivalente no sítio n2. Por sua vez, essa ligação causa uma alteração no loop que contém Asp50 (resíduo catalítico), o qual resulta em um deslocamento da cadeia lateral desse resíduo em direção ao sítio ao qual um íon amônio será ligado. Numa próxima etapa, uma molécula de glutamato entra na cavidade a partir da região inferior do bi-funil, com o grupo  $\gamma$ -carboxilato ligando adjacente ao íon bivalente no sítio n1, próximo a um loop flexível

envolvendo os resíduos 324-328. O grupo  $\gamma$ -fosfato da molécula de ATP é então transferido para o grupo  $\gamma$ -carboxilato da molécula de glutamato, formando o intermediário  $\gamma$ -glutamil-fosfato e ADP. Em seguida, um íon amônio entra no sítio ativo e é desprotonado pela cadeia lateral do resíduo de Asp50, formando amônia, a qual ataca o carbono  $\delta$  do intermediário  $\gamma$ -glutamil-fosfato, liberando o grupo fosfato e levando à formação de uma ponte salina entre o intermediário tetraédrico formado e o resíduo catalítico Glu327. Por fim, Glu327 recebe um próton do grupo  $\gamma$ -amino do intermediário tetraédrico, neutralizando a ponte salina e formando glutamina. Por não possuir interação eletrostática com o Glu327, a glutamina permite a abertura do segmento envolvendo os resíduos 324-328, sendo liberada. (ALIBHAI e VILLAFRANCA, 1994; LIAW e EISENBERG, 1994; EISENBERG *et al.*, 2000).

#### 1.4.2 Regulação da assimilação de amônio

Dada a necessidade de adaptação às flutuações na disponibilidade de amônio no ambiente e o alto gasto energético associado à fixação de nitrogênio atmosférico pelo complexo da nitrogenase, o processo de assimilação de nitrogênio em bactérias é altamente regulado tanto a nível transcricional quanto pós-traducional. A própria enzima glutamina sintetase, cuja atividade exige um gasto energético maior do que o de GDH, é um dos principais alvos de regulação. É sabido que a enzima GS de *E. coli* tem sua atividade inibida alostericamente por diversos compostos nitrogenados, como alanina, glicina, serina, histidina, CTP, AMP e carbamoil-fosfato (WOOLFOLK e STADTMAN, 1967; PIROLA *et al.*, 1992), moléculas cujo aumento da concentração no citoplasma sinaliza a suficiência de nitrogênio em diversas vias biossintéticas. GS ainda é alvo de inibição mediada pela atividade de outras proteínas, conforme descrito na sequência.

##### 1.4.2.1 Controle da atividade de GS por ATase/AR

Em proteobactérias, além da regulação alostérica, há também o controle pós-traducional da atividade de GS em resposta ao *status* de nitrogênio e carbono intracelular. Esse controle é feito pela proteína ATase/AR (GlnE), uma enzima bifuncional que pode catalisar a modificação covalente dos monômeros GS através da ligação de um grupo AMP a um resíduo conservado, oriundo de uma molécula de ATP, com a liberação de pirofosfato (PPi). Uma vez que cada uma das subunidades do dodecâmero pode ser adenililada, GS pode comportar até doze grupos AMP ligados covalentemente, sendo a atividade da enzima diminuída à medida que o número médio de subunidades adenililadas aumenta. Em *E. coli*, o resíduo de aminoácido de GS que sofre a

modificação é a tirosina 397, que está localizada no diâmetro externo da estrutura do anel hexagonal (VAN HEESWIJK *et al.*, 2013).

A enzima ATase/AR, codificada pelo gene *glnE* e inicialmente estudada em *E. coli*, é um monômero de massa molecular igual a 115 kDa (CABAN e GINSBURG, 1976) contendo dois domínios nucleotidiltransferase (NT), sendo um domínio N-terminal, responsável por catalisar a atividade adenilil removase (AR), e um domínio C-terminal, catalisador da atividade adenilil transferase (AT). Adicionalmente, um domínio central regulatório (R) de cerca de 200 aminoácidos é localizado entre os domínios N- e C-terminais, e parece estar envolvido com a transdução de sinal intramolecular, provavelmente impedindo a ativação simultânea das atividades de adenililação e desadenililação de GS (JIANG, PIOSZAK e NINFA, 2007). Esses três domínios são separados por duas regiões de interdomínios curtas (Q-linkers), de 15 a 25 aminoácidos, cuja composição tipicamente inclui resíduos de glutamina, arginina, glutamato e prolina (WOOTTON e DRUMMOND, 1989). Estudos conduzidos com a ATase de *E. coli* mostraram que, apesar do domínio N-terminal não ser ativo *in vitro*, a atividade AR é recuperada quando adicionado do domínio C-terminal. Isso sugere que os domínios de GlnE possuem comunicação e possivelmente participem na regulação um do outro (JIANG e NINFA, 2009).

A identificação de GlnE em *A. brasilense* mostrou que a sequência dos domínios nucleotidiltransferase podem ser alinhadas entre si, indicando homologia parcial entre os mesmos. Além disso, resíduos identificados como importantes para a atividade catalítica da enzima de *E. coli*, mostraram conservação na sequência de GlnE de *A. brasilense*, como os resíduos 161-169 por exemplo, que formam um loop importante para a ligação de fosfato (VAN DOMMELEN *et al.*, 2009).

Em *E. coli*, a atividade de GlnE é influenciada diretamente por glutamina, cuja ligação provável a um sítio localizado no domínio C-terminal leva à ativação da atividade AT com a concomitante inibição da atividade AR. Alternativamente, uma sinalização antagônica à glutamina é realizada por 2-oxoglutarato, o qual atua através da ligação a proteínas do tipo PII, que por sua vez interagem diretamente com GlnE (JIANG, PIOSZAK e NINFA, 2007). Em *A. brasilense*, a interação direta entre GlnE e PII ainda não foi relatada.

#### **1.4.2.2 Proteínas PII**

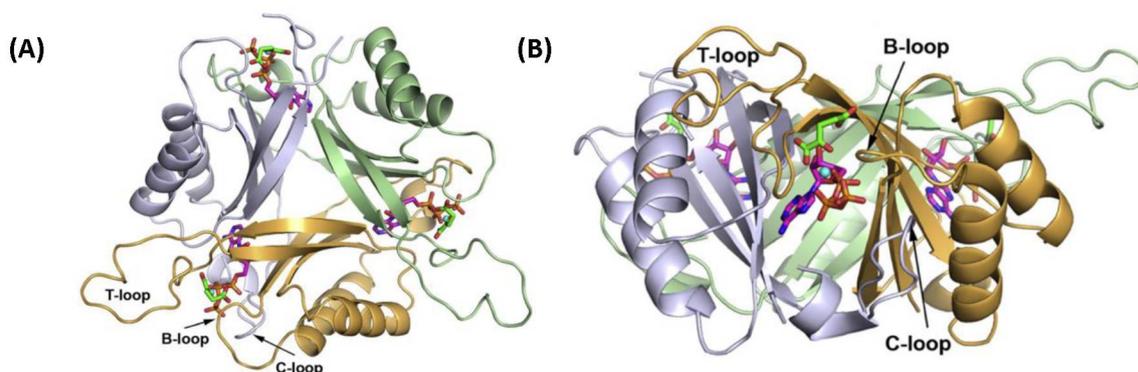
As proteínas da família PII são amplamente distribuídas nos domínios da natureza, sendo encontradas em bactérias, arqueias, e em cloroplastos de algas e plantas. Essas proteínas estão envolvidas na regulação de diferentes aspectos do metabolismo de carbono e nitrogênio, onde atuam ativando ou inibindo a atividade de proteínas alvo a depender da disponibilidade

de sinalizadores metabólicos ou da modificação covalente de PII por proteínas de modificação pós-traducional.

Análises de sequências primárias de aminoácidos e de contexto genético (organização do genoma) permitiram a classificação das proteínas PII em três grupos: GlnB/GlnK, que agrupa as proteínas mais amplamente caracterizadas GlnB (que pode formar um operon com os genes *glnA* ou *nadE*) e GlnK (normalmente parte do mesmo operon do gene *amtB*); NifI, que engloba os genes *nifH1* e *nifH2* que podem ser encontrados em operons dos genes relacionados à FBN; e PII-NG, um novo grupo menos caracterizado que contém proteínas relacionadas ao transporte de metais (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Em *A. brasilense*, existem dois homólogos de PII, GlnB (coexpressa com GlnA) e GlnZ (ortóloga de GlnK, não coexpressa com AmtB) (TRUAN *et al.*, 2010).

Em proteobactérias, os membros da família PII tipicamente contém 112 resíduos de aminoácidos e compartilham características estruturais conservadas. A partir de determinações cristalográficas de uma série de proteínas PII de diferentes organismos, foi constatado que são proteínas homotriméricas de massa molecular de aproximadamente 37 kDa, com subunidades contendo entre 12-13 kDa. As três subunidades, cada uma compreendendo duas  $\alpha$ -hélices e quatro  $\beta$ -folhas, estão associadas em um cilindro compacto arranjado em um motivo  $\beta\alpha\beta$  conectado por uma alça longa denominada loop T (Figura 4) (TRUAN *et al.*, 2010; HUERGO, CHANDRA e MERRICK, 2013). Em muitas bactérias, esse loop contém um resíduo de Tyr51 passível de modificação pós-traducional por uridililação, caracterizado pela primeira vez em *E. coli* (SON e RHEE, 1987). Além disso, estudos de mutagênese de GlnB de *E. coli* mostraram que o loop T é essencial para ligação de PII a diversas proteínas alvo (GlnD, GlnE e NtrB) e moléculas efetoras (JIANG *et al.*, 1997b). As proteínas PII também possuem um segundo loop localizado entre a segunda  $\alpha$ -hélice e a quarta  $\beta$ -folha, denominado loop B, e um terceiro loop localizado na região C-terminal, denominado loop C (Figura 4). Os loops T e B de uma subunidade e o loop C de outra formam uma fenda entre os monômeros importante para a ligação de moléculas efetoras (TRUAN *et al.*, 2010; HUERGO, CHANDRA e MERRICK, 2013).

**Figura 4 - Representação estrutural do trímero de GlnZ de *A. brasilense***



O trímero de PII forma um barril compacto no qual cada monômero compreende duas  $\alpha$ -hélices e quatro  $\beta$ -folhas, de modo que as hélices  $\alpha$  e  $\beta$  formam um motivo  $\beta\alpha\beta$  duplo conectado por uma alça longa, denominada loop T. Esse loop contém um resíduo de tirosina (Try51) que pode ser modificado covalentemente (não destacado). A ligação de ATP (rosa), 2-OG (verde) e  $Mg^{2+}$  (azul) é mostrado em vista superior (A) e lateral (B). Os loops T (resíduos 37-55), B (resíduos 82-88) e C (102-105) estão indicados com setas. Fonte: TRUAN *et al.*, 2010.

As proteínas PII são transdutores de sinal cuja atividade é influenciada diretamente por moléculas efetoras, como ATP, ADP e 2-oxoglutarato. Essas moléculas ligam-se a sítios amplamente conservados nas fendas localizadas entre os monômeros em resposta a variações no estado energético e de nitrogênio intracelular. Estudos realizados em GlnB de *E. coli* demonstraram que ATP e ADP se ligam competitivamente, e que a ligação de 2-oxoglutarato e ATP ocorre de forma cooperativa. Os dados obtidos sugerem que PII possivelmente adote duas conformações funcionalmente distintas, sendo uma influenciada por altos níveis intracelulares de 2-OG, que leva à ligação cooperativa de 2-OG e ATP; e uma segunda em baixas concentrações de 2-OG, que favorece a ligação de ADP, embora estados intermediários com uma mistura de locais ligados a ATP e ADP pareçam ser viáveis (JIANG e NINFA, 2007). Experimentos realizados com as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* por Gerhardt e colaboradores (2012) mostraram resultados semelhantes, indicando que a concentração de 2-OG é um fator chave na ocupação de PII por ATP ou ADP, os quais se ligam competitivamente, e que a ligação de MgATP e 2-OG é um pré-requisito para a uridililação de PII por GlnD. Embora haja grande conservação de sequência e funcionalidade entre as proteínas PII, detalhes dos parâmetros de interação com 2OG, ATP e ADP diferem entre os microrganismos (ver, por exemplo, JONSSON e NORDLUND, 2007; GERHARDT *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015), exigindo ainda mais cautela do que os demais componentes do sistema de regulação da assimilação de nitrogênio no tocante à extrapolação de resultados obtidos em *E. coli* para as demais proteobactérias.

### 1.4.2.3 Modificação de PII por UTase/UR

Assim como GlnE, a enzima UTase/UR é uma proteína bifuncional que leva ao controle pós-traducional de proteínas alvo através da modificação covalente reversível de subunidades, alterando a atividade das mesmas em respostas a sinalizadores do *status* energético, carbono e nitrogênio na célula. Em *E. coli*, onde GlnD foi mais bem caracterizada, foi mostrado que o gene *glnD* codifica para uma proteína de 890 aminoácidos e aproximadamente 100 kDa (VAN HEESWIJK *et al.*, 1993), que possui quatro domínios: um domínio N-terminal que possui um motivo nucleotidiltransferase (NT), responsável pela atividade uridilil transferase que leva à transferência de um grupo UMP para o resíduo de Try51 de PII; um domínio HD, que recebe esse nome por possuir resíduos de histidina e aspartato conservados (H552 e D533 em *E. coli*) e catalisa a remoção de grupo uridilil modificante; e dois domínios ACT C-terminais, que controlam a atividade de GlnD por meio do sensoriamento e ligação de glutamina em resposta à concentração de nitrogênio (ZHANG *et al.*, 2010).

Estudo realizados com a proteína de *E. coli* mostraram que a presença de glutamina estimula a atividade de uridilil removase de GlnD, levando à hidrólise de PII-UMP a uma concentração de glutamina de aproximadamente 80  $\mu$ M. Concomitantemente, a ligação de glutamina também leva à inibição da atividade uridilil transferase ( $K_i$  (gln) = 70-80  $\mu$ M), provavelmente devido à inibição da etapa catalítica da reação de transferase, enquanto a atividade de removase é estimulada pela redução do  $K_m$  e aumento do  $K_{cat}$ . O sítio de ligação de glutamina em GlnD tem sido atribuído ao domínio ACT, já que a deleção do mesmo resultou em alteração do perfil de ativação dos domínios em resposta à presença desse sinalizador (FORCHHAMMER, 2007; ZHANG *et al.*, 2010). Além disso, foi mostrado que ambas as reações, UTase e UR, são ativadas indiretamente pela ligação de ATP e 2-OG a PII e PII-UMP (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998). Estudos *in vitro* realizados por Araújo e colaboradores (2008) mostraram que a uridililação das proteínas GlnB e GlnZ por GlnD de *A. brasilense* é um processo dependente de ATP e 2-OG, e que a presença de glutamina estimula a desuridililação de PII.

O efeito da sinalização de glutamina que leva à uridililação/desuridililação de PII em resposta a alterações na disponibilidade de amônio, é transmitido para receptores específicos envolvidos em diferentes aspectos do metabolismo do nitrogênio. Por sua vez, esses receptores desencadeiam uma cascata de regulação na célula que altera os padrões de fixação de nitrogênio e assimilação de amônio. Em *E. coli*, os principais receptores incluem o transportador de amônio AmtB (seção 1.4), ATase/AR (seção 1.4.2.1), além de NtrB (parte do sistema de dois componentes regulatório NtrB-NtrC), e NifA, o regulador direto da transcrição dos genes *nif*

(este último ausente em *E. coli*). Esses dois últimos serão explicados em mais detalhes nas seções seguintes.

#### 1.4.2.4 Sistema regulatório de dois componentes NtrB-NtrC

A enzima uridilil transferase/uridilil removase é considerada o sensor primário do *status* de nitrogênio na célula e altera reversivelmente o estado de uridililação de PII que, por sua vez, modula a atividade de NRII (NtrB) e NRI (NtrC), um sistema regulatório de dois componentes que consiste em um sensor/transmissor e uma proteína receptora/reguladora de resposta. Em *E. coli*, organismo no qual esse sistema foi amplamente estudado, o gene *glnL* (*ntrB*) codifica para uma proteína de 349 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 36 kDa por monômero e forma homodímeros em solução. Cada subunidade de NtrB consiste de três domínios: um domínio sensor amino-terminal de aproximadamente 120 aminoácidos; um domínio central helicoidal de dimerização e que contém um resíduo de histidina (His139), sítio de autofosforilação (NINFA e BENNETT, 1991; JIANG *et al.*, 2000); e um domínio C-terminal que é responsável por ligar nucleotídeos. Os dois últimos domínios, que compreendem cerca de 230 aminoácidos, compõem o módulo transmissor com atividades quinase e fosfatase (JIANG *et al.*, 2000).

O domínio C-terminal de NtrB, envolvido com a ligação a ATP, também contém o sítio de ligação a PII (PIOSZAK, JIANG e NINFA, 2000). Tal como acontece com muitas outras interações de proteínas PII com seus alvos, a interação de GlnB com NtrB é regulada tanto pelo estado de modificação de GlnB quanto pela presença de moléculas efetoras. Estudos de avaliação do efeito de 2-oxoglutarato na regulação das atividades quinase e fosfatase de NtrB de *E. coli* revelaram que, quando não complexada a 2-OG, PII não é capaz de ligar NtrB, cuja atividade quinase torna-se predominante. Segundo modelo proposto, quando as concentrações de 2-OG estão baixas, o trímero de PII (não modificado por GlnD) complexado a uma única molécula de 2-OG interage com NtrB, levando à inibição de sua atividade de quinase e ativando a atividade de fosfatase (JIANG e NINFA, 1999). Essa ligação envolve o loop T de GlnB, que é projetado para fora do trímero (JIANG, ZUCKER e NINFA, 1997). Entretanto, quando as concentrações de 2-OG estão elevadas, PII-UMP liga moléculas de 2-OG adicionais e torna-se incapaz de interagir com NtrB. Nessas condições, há a liberação da inibição sobre a atividade quinase, que leva à autofosforilação de NtrB (JIANG e NINFA, 1999). A reação de autoquinase prossegue pela ligação de ATP a um monômero, seguida de fosforilação do monômero oposto. NtrB-P, por sua vez, transfere o fosfato para NtrC, que então atua como ativador transcricional (NINFA *et al.*, 1993).

O gene *glnG* (*ntrC*) codifica para uma proteína de 468 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 55 kDa por monômero, e forma dímeros em solução (REITZER e MAGASANIK, 1983). O homodímero de NtrC possui uma arquitetura característica de ativadores transcricionais dependentes de  $\sigma^{54}$ , com três regiões: um domínio N-terminal de função regulatória, que possui aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos e um resíduo de aspartato conservado (Asp54), que é sítio de fosforilação por NtrB (SANDERS *et al.*, 1992); uma região central, que contém um domínio ATPase AAA<sup>+</sup> que interage com o fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase e promove a hidrólise de ATP, importante para a formação do complexo aberto de início de transcrição (WEISS *et al.*, 1991); e um domínio C-terminal, que contém um motivo hélice-volta-hélice para ligação às regiões promotoras dos genes-alvo e determinante para a dimerização de NtrC (KLOSE *et al.*, 1994). Os domínios N-terminal e central são conectados por uma região de interdomínios (Q-linker) flexível (WOOTTON e DRUMMOND, 1989). Uma vez fosforilado, NtrC forma um oligômero facilitado pela região central (FLASHNER *et al.*, 1995), que leva a um aumento de afinidade de ligação ao DNA e da atividade ATPase, promovendo a iniciação da transcrição de genes específicos. Em seguida, a terminação da ativação de transcrição ocorre por meio da atividade de fosfatase associada à NtrB ou por uma atividade de autofosfatase inerente à NtrC (KEENER e KUSTU, 1988).

#### 1.4.2.5 Regulação transcricional da assimilação de amônio

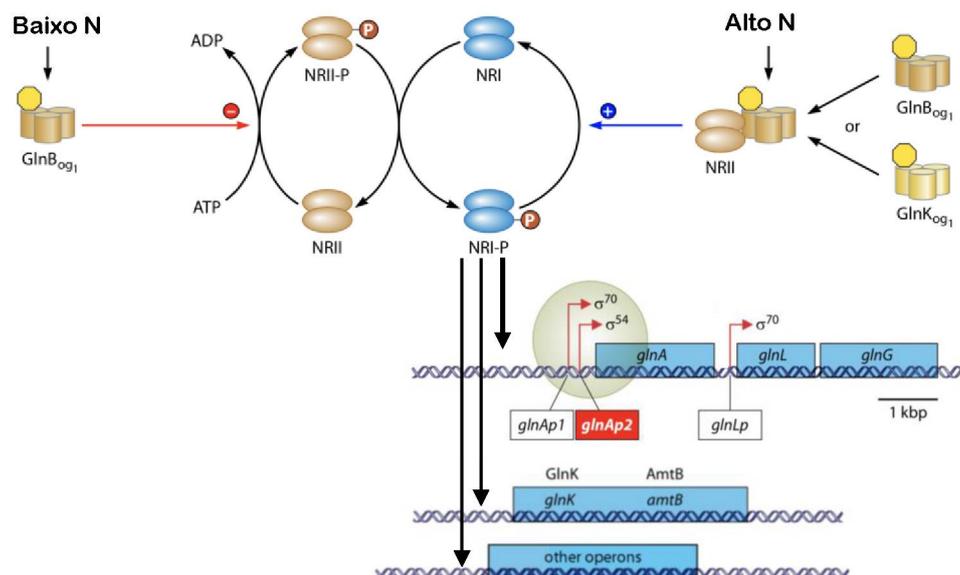
Além do controle pós-traducional de GS mediado pelas enzimas bifuncionais UTase/UR e ATase/AR e coordenado por PII, a assimilação de amônio também é indiretamente regulada no nível de expressão gênica pelo sistema NtrBC e a proteína RpoN, que juntos controlam a transcrição de proteínas envolvidas no processo.

O gene *rpoN*, também conhecido como *ntrA* e *glnF*, codifica para o fator  $\sigma^{54}$  (ou  $\sigma^N$ ) que é envolvido no controle da expressão de diversos genes do metabolismo de nitrogênio. A RNA polimerase associada com  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^{54}$ -RNA polimerase) liga-se a uma sequência consenso do DNA no sítio de início de transcrição característica: GG (posição -25/-24) e GC (posição -13/-12). Diferentemente de enzima  $\sigma^{70}$ -RNA polimerase, a holoenzima  $\sigma^{54}$ -RNA polimerase requer a interação com uma proteína ativadora para que ocorra a formação do complexo aberto de transcrição. Essas proteínas ativadoras, denominadas EBPs (*enhancer binding proteins*), se ligam a uma região localizada cerca de 100 pb do sítio de iniciação de transcrição, denominada UAS (*upstream activator sequence*) e contém um motivo característico GAFTGA essencial para ligação ao  $\sigma^{54}$  e o acoplamento dos processos de hidrólise de ATP e formação do complexo aberto de transcrição (DIXON e KAHN, 2004). A proteína NtrC é um exemplo das proteínas pertencentes à família EBPs.

O sistema NtrBC controla a expressão de diversos genes relacionados à FBN. Em *E. coli*, o gene *glnA* faz parte de um operon com *ntrBC* denominado *glnALG* ou *glnA-ntrBC*, o qual possui dois promotores: *glnAp1*, um promotor fraco distal contendo o sítio de ligação de  $\sigma^{70}$ , cuja transcrição pode ser ativada por CRP-cAMP e inibida por NtrC-P; e *glnAp2*, um promotor forte proximal contendo sítio para  $\sigma^{54}$  que é ativado por NtrC-P e inibido por CRP-cAMP. Dessa forma, o promotor *glnAp2* é o responsável pelo aumento da transcrição de *glnA* (e conseqüentemente *ntrBC*) em condições de deficiência de nitrogênio (REITZER e MAGASANINK, 1985; TIAN *et al.*, 2001). Para que ocorra a ativação do promotor *glnAp2*, NtrC-P liga-se a uma sequência ativadora (UAS) nas regiões -140/-108, e forma um oligômero para ativar a transcrição pela interação direta com o  $\sigma^{54}$ . Essas regiões são necessárias para a ativação da transcrição sob baixas concentrações de NtrC-P, já que sob altas concentrações a estimulação ocorre sem sítios de ligação específicos (REITZER e MAGASANIK, 1986). Além desses dois promotores à montante do gene *glnA*, há ainda um terceiro promotor  $\sigma^{70}$  localizado à montante de *glnL*, *glnLp*. Assim como *glnAp1*, esse promotor possui um sítio de ligação para NtrC sobreposto à região de início de transcrição. Isso significa que quando os níveis de amônio estão elevados, o operon *glnALG* é transcrito a níveis basais pela holoenzima  $\sigma^{70}$ -RNA polimerase a partir dos promotores *glnAp1* e *glnLp*, os quais são reprimidos pela ligação de NtrC não fosforilada (REITZER e MAGASANIK, 1986).

Em uma gama diversificada de bactérias, incluindo *E. coli*, os genes *glnK* e *amtB* são agrupados em um operon que não é constitutivamente expresso. Assim como observado para *glnA-ntrCB*, a região à montante do operon *glnK-amtB* contém um sítio único e característico de ligação de  $\sigma^{54}$ . Além disso, o promotor de *glnK* é regulado por NtrC-P, o qual se liga à um sítio de alta afinidade a NtrC-P adjacente a um sítio de baixa afinidade em condições de baixos níveis de amônio. Como consequência, o promotor de *glnK* é ativado somente quando a concentração de NtrC-P é próxima à máxima fisiológica (VAN HEESWIJK *et al.*, 1996). Assim como GlnB, GlnK também é capaz de causar a modificação de GS via ATase (VAN HEESWIJK *et al.*, 1996; BLAUWKAMP e NINFA, 2002). A Figura 5 resume a regulação da transcrição de genes envolvidos com a assimilação de amônio através do sistema de dois componentes formado por NtrB e NtrC.

**Figura 5 - Regulação da transcrição de genes relacionados à assimilação de amônio por NtrB-NtrC**



A uridilação de GlnB mediada por GlnD em condições de limitação de nitrogênio impede a associação de GlnB-UMP e NRII (NtrB), que se autofosforila pela ligação de ATP por uma subunidade, seguida de fosforilação intermonômeros *in trans* dentro do dímero de NRII. Em seguida, há a transferência do grupo fosforil para NRI (NtrC), que por sua vez regula a transcrição de operons relacionados à assimilação de amônio, como exemplificados por *glnALG* e *glnK-amtB*. Mediante altas concentrações de amônio, PII não modificada e ligada a três moléculas de ATP e uma de 2-OG é capaz de interagir com NRII, que estimula a hidrólise do grupo fosforil de NRI. Nessas condições a ativação da transcrição de genes do metabolismo do nitrogênio não ocorre. As setas indicam os sítios de início de transcrição das regiões promotoras. Adaptado de VAN HEESWIJK, WESTERHOFF e BOOGERD, 2013.

Estudos de caracterização dos genes *glnE* e *glnD*, que codificam para as enzimas ATase/AR e UTase/UR, respectivamente, foram inicialmente feitos em *E. coli* (VAN HEESWIJK, 1993). O gene *glnD* foi localizado entre um intervalo de cerca de 2,7 Kb separando os genes *map* e *dapD*, precedido por um terminador independente à jusante de *map*. A transcrição constitutiva de *glnD* a partir de promotor próprio mostrou ocorrer de forma independente do *status* de nitrogênio ou de  $\sigma^{54}$ . Por sua vez, *glnE* foi identificado à jusante de uma ORF denominada *orfXE*. A ausência de identificação de estrutura de terminação independente na região intergênica sugere que essas regiões formem um operon *orfXE-glnE* e sejam cotranscritas. Assim como para *glnD*, a expressão de *orfXE-glnE* não é regulada em resposta aos níveis de amônio ou da presença de  $\sigma^{54}$  (VAN HEESWIJK, 1993).

#### 1.4.2.6 Regulação transcricional da assimilação de amônio em *A. brasilense*

Na seção 1.4.2.5, foi descrita a regulação da transcrição de genes envolvidos na assimilação de amônio de proteobactérias, baseando-se principalmente nos avanços obtidos na

compreensão do sistema de *E. coli*, o qual parecer apresentar ampla distribuição nos organismos. Entretanto, há algumas diferenças importantes descritas para os componentes de *A. brasilense*, principalmente no que diz respeito à organização genômica de operons e a regulação da expressão gênica.

O gene *rpoN* identificado em *A. brasilense* apresentou alto grau de homologia com outros membros da família  $\sigma^{54}$ . Assim como descrito para outros organismos, *rpoN* mostrou ser essencial para a fixação de nitrogênio, assimilação de nitrato e transporte de amônio, bem como na biossíntese flagelar (MILCAMPS *et al.*, 1996).

Diferentemente da organização estrutural *glnA-ntrCB* de *E. coli*, em *A. brasilense* os genes *ntrBC* estão localizados em uma região distante de *glnA*, e não são essenciais para fixação de nitrogênio (LIANG, ARSENE e ELMERICH, 1993). Alternativamente, o gene *glnA* faz parte de um operon com *glnB*, enquanto *ntrBC* fazem parte de um operon com *nifR3* (*nifR3-ntrBC*). Estudos de caracterização de região promotora mostraram que *glnA* pode ser cotranscrito juntamente com *glnB* a partir dos promotores *glnBp1*- $\sigma^{70}$  e *glnBp2*- $\sigma^{54}$ , dependendo do *status* de nitrogênio intracelular. Em condições de fixação de nitrogênio, *glnB* e *glnA* são cotranscritos em altos níveis a partir do promotor *glnBp2*- $\sigma^{54}$ , enquanto condições de suficiência de nitrogênio levam a uma expressão baixa desses genes a partir do promotor *glnBp1*- $\sigma^{70}$ , o qual possui sobreposição a um possível sítio de ligação para NtrC. Alternativamente, a transcrição isolada de *glnA* parece ser dependente de um outro promotor regulado por nitrogênio, o qual parece ser mais ativo em condições de excesso de amônio (ZAMAROCZY *et al.*, 1990, ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Além disso, estudos de regulação da expressão de *glnBA* por NtrC mostraram que a transcrição de *glnBA* via *glnBp2* em condições de limitação de nitrogênio é dependente de NtrC, que pode se ligar a dois sítios de ativação (UAS) localizados à montante do promotor *glnBp2* (sobrepuesto ao promotor *glnBp1*). Por outro lado, a expressão isolada de *glnA* parece não ser controlada por NtrC, mas dependente da presença de GlnB (HUERGO *et al.*, 2003).

Diferentemente de bactérias entéricas, em *A. brasilense* o gene *amtB* não é localizado na vizinhança de *glnB* ou *glnZ*, e sua expressão é monocistrônica. A região do promotor *amtB* é caracterizada por uma sequência consenso de  $\sigma^{54}$  e também requer ativação pelo sistema de dois componentes NtrBC para transcrição, que ocorre de forma aumentada em condições de limitação de nitrogênio (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). Semelhantemente, a transcrição de *glnZ* de *A. brasilense* é monocistrônica e ocorre a partir de um promotor dependente de  $\sigma^{54}$ , o qual é ativado por NtrC tanto em condições de escassez quanto excesso de nitrogênio. Assim como para GlnB, há evidências de que GlnZ de *A. brasilense* não participe da modificação reversível de GS, apesar de GlnB-UMP ter sido mostrado capaz de estimular a desadenililação

máxima de GS (DE ZAMAROCZY, 1998). Apesar de serem expressos de regiões distintas, especulou-se que a proteína GlnZ poderia estar envolvida na modulação da atividade de AmtB, já que GlnZ mostrou regular negativamente a captação de [<sup>14</sup>C]-metilamônio e não está envolvida com a regulação dependente de NtrC (DE ZAMAROCZY, 1998).

Em *A. brasilense*, o gene *glnD* foi isolado a partir de uma biblioteca de mutantes cromossomais obtidos com a inserção do transposon Tn5-B30 com fenótipo negativo para transporte de metilamônio e crescimento em nitrato. O gene identificado continha 2799 pb e codificava para um produto de 933 aminoácidos, com massa molecular aproximada de 104,6 kDa. Nenhuma ORF foi detectada nos 170 e 400 pb localizados à montante e à jusante de *glnD*, respectivamente. A expressão de *glnD* é aumentada em células sujeitas a limitação de nitrogênio, porém esta regulação é apenas parcialmente dependente do sistema Ntr. Nenhuma região promotora ou sequência regulatória foi sugerida para este gene (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). Curiosamente, experimentos de atividade biossintética e de modificação pós-traducional de GS em mutante de *glnD* revelaram ausência de diferença na atividade biossintética entre as estirpes selvagem e mutante. Além disso, o estado de adenililação de GS em condições de excesso de nitrogênio foi semelhante entre as estirpes, enquanto em condições de limitação de nitrogênio o nível de adenililação de GS do mutante foi superior em relação à estirpe selvagem. Esse resultado sugere que GlnD não está relacionada com a modulação da atividade de GS, mas é necessária para a desadenililação completa da enzima (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002).

Por sua vez, o gene *glnE* foi isolado a partir da estirpe Sp7 de *A. brasilense* utilizando *primers* desenhados com base em sequências conservadas de glutamina sintetase adenililtransferases. A sequência gênica completa foi recuperada a partir de uma montagem genômica da estirpe Sp245 e continha 3012 pb. As ORFs localizadas ao redor de *glnE* parecem ser mais similares às encontradas próximas ao gene *glnE* de *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, com uma possível região codificadora para uma proteína hipotética transportadora de membrana à montante e uma proteína semelhante à classe peroxirredoxinas à jusante, a qual pode estar envolvida com a proteção de GS contra radicais de oxigênio (VAN DOMMELEN *et al.*, 2009). Isto pois, sob crescimento estacionário em condições de limitação de nitrogênio, o nível de GS diminui rapidamente por inativação oxidativa mediada por espécies reativas de oxigênio (STADTMAN, 2001). Além disso, uma análise da atividade transferásica da forma não adenililada de GS a partir de uma estirpe mutante de *glnE* mostrou semelhança em relação à estirpe selvagem Sp7 em condições de fixação de nitrogênio. Adicionalmente, também foi constatada ausência de diferença na atividade de GS do mutante *glnE* crescido em condições

de limitação ou excesso de nitrogênio. Esses resultados sugerem que a ausência de adenililação não é letal em *A. brasilense* (VAN DOMMELEN *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.7 Modelo de regulação de assimilação de amônio

Conforme discutido anteriormente, o processo de assimilação de amônio compreende uma rede regulatória complexa que envolve transporte, sinalização, metabolismo, modificação pós-traducional e transcrição (VAN HEESWIJK *et al.*, 2013). No que se refere ao nível proteico, os componentes incluem, ao menos, um transportador de amônio (AmtB), duas vias de assimilação de amônio (GS-GOGAT e GDH), duas enzimas bifuncionais de modificação pós-traducional (GlnE e GlnD), duas proteínas de transdução de sinal triméricas (GlnB e GlnK) e um sistema regulatório de dois componentes (NtrB e NtrC). No nível metabólico, os aminoácidos glutamina e glutamato, as moléculas ATP e ADP, os equivalentes de estado redox NADPH/NADP<sup>+</sup>, e o intermediário 2-oxoglutarato do ciclo do ácido cítrico, são metabólitos que participam de forma direta nas vias de assimilação de amônio. A incorporação de amônio a moléculas orgânicas foi mais bem caracterizada em *E. coli*, e *A. brasilense* parece utilizar as mesmas vias e recorrer a processos regulatórios relativamente semelhantes.

Resumindo, em condições fixação de nitrogênio, quando os níveis de glutamina estão baixos e há abundância de 2-OG, a ativação da atividade UTase de GlnD promove a uridililação do resíduo de Try51 conservado no loop T de PII, utilizando uma molécula de UTP. PII-UMP, por sua vez, não é capaz de interagir com o transportador de amônio AmtB ou com o regulador NtrB, ocasionando captação de amônio e fosforilação de NtrC, respectivamente. NtrC fosforilado então ativa a transcrição de genes dependentes de  $\sigma^{54}$  relacionados ao metabolismo do nitrogênio. Além disso, PII-UMP estimula a atividade AR de GlnE, possivelmente pela interação com o domínio C-terminal da enzima. Nessas condições, a remoção de grupos adenilil dos monômeros de GS recupera sua atividade, levando à incorporação de amônio em glutamina e depois glutamato pela via GS-GOGAT (Figura 6).

Mediante choque de amônio, quando há queda na concentração de 2-OG e elevação dos níveis de glutamina intracelular, a ligação direta de glutamina à GlnD estimula a ativação de sua atividade UR, causando remoção de grupos uridilil modificantes de PII. Por sua vez, a proteína PII GlnK (ou GlnZ em *A. brasilense*) forma um complexo ternário com o transportador de amônio AmtB localizado na membrana celular, enquanto GlnB interage com o regulador NtrB para estimular a desfosforilação de NtrC, o que reprime a transcrição de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio. Nessas condições, PII também interage com GlnE (provavelmente no domínio N-terminal), causando a adenililação dos monômeros de GS



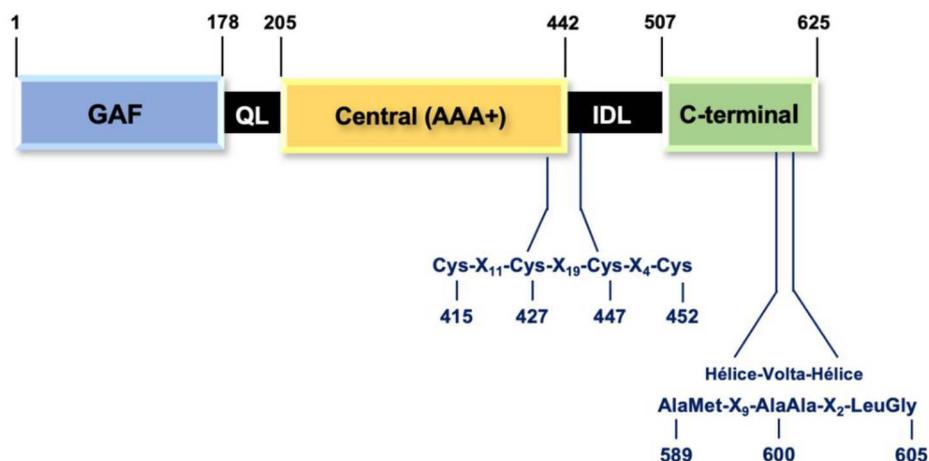
dos genes *nif*), quanto a nível pós-traducional (atividade da nitrogenase). Além dos reguladores globais mencionados nas seções anteriores, uma outra proteína passível de regulação por PII, denominada NifA, é o ativador transcricional central da expressão dos genes *nif* em proteobactérias diazotróficas. A regulação mediada por NifA fornece uma expressão controlada dos genes da nitrogenase em resposta às concentrações de nitrogênio e oxigênio ambientais, evitando ciclos fúteis de fixação de N<sub>2</sub> e protegendo o complexo da nitrogenase contra degradação.

### 1.5.1 Estrutura e função dos domínios de NifA

A proteína NifA é um ativador transcricional dependente de  $\sigma^N$  e, assim como NtrC, pertencente à família das EBPs (*enhancer-binding proteins*). Por outro lado, diferentemente do domínio receptor típico de dois componentes fosforilável de NtrC, NifA contém um domínio GAF N-terminal que controla sua atividade por meio da interação com outras proteínas em resposta ao *status* de nitrogênio na célula, como PII e NifL (DIXON e KAHN, 2004).

A organização estrutural dos domínios de NifA é semelhante àquela observada em outros membros da família das EBPs, na qual um domínio central catalítico é flanqueado por um domínio amino-terminal regulatório e um domínio carboxi-terminal ligador de DNA (DRUMMOND *et al.*, 1986; FISCHER *et al.*, 1988). Em *A. brasilense*, o domínio N-terminal de NifA é responsável pelo controle negativo da atividade da proteína em resposta aos níveis de íons amônio (ARSENE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996) e é conectado por uma região de interdomínio, denominada QL (*Q-linker*), ao domínio central. O domínio central possui 237 resíduos de aminoácidos e apresenta função na interação com o fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase, além de possuir um motivo AAA+ de hidrólise de ATP, necessária para ativar a transcrição a partir de promotores dependentes de  $\sigma^{54}$  (GONZALEZ *et al.*, 1998). O domínio carboxi-terminal (C-terminal) possui 118 resíduos de aminoácidos e contém um motivo hélice-volta-hélice de ligação à sequências ativadoras UAS localizadas à montante do sítio de iniciação de transcrição (MORETT, CANNON e BUCK, 1988). Em *A. brasilense*, os domínios central e C-terminal são ligados pela região interdomínio IDL. No final do domínio central e início da região interdomínio IDL há ainda um motivo de quatro cisteínas regularmente espaçadas (posições 415, 427, 447, 452), provavelmente envolvidos com a sensibilidade de NifA a oxigênio (FISCHER, 1994) (Figura 7).

**Figura 7 - Modelo estrutural esquemático dos domínios funcionais da proteína NifA de *A. brasilense***



O domínio amino-terminal contendo o motivo GAF (resíduos 1-178) destacado em azul corresponde ao domínio regulatório de NifA. Em amarelo está representado o domínio central (resíduos 205-442) que contém um motivo GAFTGA conservado envolvido na interação com o fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase, além dos motivos de Walker para ligação de ATP. O domínio carboxi-terminal (resíduos 507-625) envolvido na ligação de sequências ativadoras de DNA (UAS) no promotor dos genes *nif* encontra-se destacado em verde claro. Em azul escuro estão indicados o cluster conservado de 4 cisteínas (415, 427, 447 e 452) e o motivo hélice-volta-hélice. Os números em preto indicam a posição dos aminoácidos na proteína NifA. Fonte: APOLONIO (2018)

### 1.5.2 Modulação da atividade de NifA em organismos diazotróficos

Na maioria dos organismos diazotróficos estudados, a expressão do gene *nifA* está sob controle do sistema Ntr. Em *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo, a proteína NtrC fosforilada atua como um ativador transcricional do gene *nifA* que, uma vez expresso, leva à ativação da transcrição dos operons *nif*, incluindo os genes estruturais da nitrogenase *nifHDK* (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *A. brasilense*, o gene *nifA* é expresso independentemente da concentração de amônio ou oxigênio. Entretanto, os níveis de expressão são significativamente inferiores em condições incompatíveis com a fixação de nitrogênio, indicando repressão parcial da transcrição do mesmo nessas condições. Além disso, as proteínas NtrBC parecem não apresentar papel crucial na expressão de *nifA*, o que é consistente com a ausência de sequência consenso de  $\sigma^{54}$  em seu promotor (LIANG, KAMINSKI e ELMERICH, 1991; FADEL-PICHETH, *et al.*, 1999). Por outro lado, NtrC é requerida para fixação ótima de nitrogênio e expressão maximizada de *nifA* em condições de deficiência de nitrogênio, apesar de provavelmente não ser resultado da ligação direta no promotor de *nifA* (LIANG, ARSENE e ELMERICH, 1993).

Uma vez expressa, NifA de *A. brasilense* tem sua atividade regulada negativamente pelos níveis de amônio e oxigênio. Experimentos iniciais realizados por De Zamaroczy e

colaboradores (1993) mostraram que, apesar da expressão de *nifA* não ser dependente de GlnB, o gene *nifH* não é expresso neste mutante, sugerindo que NifA necessita de GlnB para adotar sua conformação ativa. Zhou e colaboradores (2008) mostraram através de ensaio de co-precipitação *in vitro* que as regiões entre os resíduos de aminoácidos 66-88 e 165-176 da proteína NifA possuem função crítica na interação entre GlnB e o domínio N-terminal de NifA de *A. brasilense*. Por outro lado, uma única mutação de um resíduo de aminoácido na posição 18 de tirosina para fenilalanina no domínio GAF foi suficiente para permitir o escape do controle de NifA por GlnB, mas não do controle por amônio (ARSENE, KAMINSKI e ELMERICH, 1999).

Com o intuito de esclarecer o mecanismo de inibição de NifA, deleções de trechos da região N-terminal de NifA foram realizadas e geraram variantes proteicas capazes de restaurar a atividade de fixação de nitrogênio quando expressas a partir de plasmídeo em um mutante *nifA* de *A. brasilense*, independentemente da concentração de amônio. Esse resultado sugere que a porção N-terminal não é essencial para a atividade de NifA, mas é importante para a inibição da proteína na presença de amônio (ARSENE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996). Adicionalmente, experimentos de ativação transcricional de uma fusão *nifH::lacZ* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* expressa em *E. coli* mostraram ausência de controle por amônio (NISHIKAWA, 2010), o qual é recuperado quando a mesma é co-expressa com o seu domínio N-terminal isolado (SOTOMAIOR *et al.*, 2012), reiterando que a interação direta entre os resíduos dos diferentes domínios poderia explicar a inibição de NifA pelo seu domínio GAF na presença de amônio. Por outro lado, a inibição de NifA parece ser aliviada pela interação com a proteína GlnB uridililada em baixos níveis de amônio (ARAUJO *et al.*, 2004). Estes dados levaram a formulação da hipótese de que em *A. brasilense* a região N-terminal de NifA inibe a atividade da proteína em condições de excesso de nitrogênio e que, em condições de fixação de nitrogênio, GlnB -UMP se ligaria a NifA, removendo o efeito inibitório do domínio N-terminal.

Apesar da evidência de que o domínio GAF não é essencial para a atividade de NifA, a deleção cromossomal dessa região em *A. brasilense* mostrou gerar uma proteína incapaz de ativar a transcrição dos genes *nif* (Nif), o que foi constatado por ensaios de ativação de fusão transcricional e determinação de atividade de nitrogenase (APOLONIO, 2018). Esse resultado sugere a truncagem da porção 5' do gene *nifA* no genoma possivelmente resulte em uma proteína fracamente expressa e/ou de baixa estabilidade.

A regulação de NifA de *A. brasilense* encontra paralelos com a regulação de NifA em outras  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactérias, em especial *Rhodospirillum rubrum* ( $\alpha$ -Proteobacteria, Rhodospirillaceae), *Herbaspirillum seropedicae* ( $\beta$ -Proteobacteria, Oxalobacteraceae) e

*Rhodopseudomonas palustris* ( $\alpha$ -Proteobacteria, Bradyrhizobiaceae). Tal qual observado em *A. brasilense*, em *R. rubrum* NifA parece requerer a interação com GlnB-UMP para ser ativada em resposta aos baixos níveis de amônio. Zou e colaboradores (2008) identificaram uma série de mutações no domínio GAF de NifA de *R. rubrum* capazes de gerar variantes ativas da proteína mesmo na ausência de GlnB. A atividade de variantes de NifA contendo as mutações M173I e M176V, por exemplo, mostrou não ser responsiva aos níveis de amônio.

A proteína NifA de *H. seropedicae* também tem sua atividade controlada negativamente pelo seu domínio N-terminal em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular (MONTEIRO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1999). Neste organismo, Stefanello e colaboradores (2018) mostraram através de experimentos de mutagênese aleatória de variantes quiméricas de NifA que mutações pontuais conduzidas no segmento C-terminal do domínio GAF e início da região de interdomínio QL, como as mutações R188P, V176G, Q182R, Q184P, L190P, geram proteínas ativas independentemente dos níveis de amônio. Além disso, essas variantes mutantes parecem não requererem a presença de GlnB ou GlnK para sua ativação.

Em *R. palustris*, onde a regulação de NifA por GAF parece ser semelhante à observada em *H. seropedicae*, foram identificados mutantes capazes de produzir hidrogênio via nitrogenase na presença de amônio, e quatro desses mutantes (M202K, Q209P, L212R, S213P) possuíam mutação em *nifA* (REY *et al.*, 2007). Interessantemente, a nitrogenase desses mutantes não exibiu regulação pelos níveis de amônio, embora *R. palustris* pareça possuir homólogos *draTG*. Além disso, a deleção de 16 aminoácidos (aminoácidos 202-217) do Q-linker aparentemente gerou uma proteína NifA conformacionalmente ativa mesmo na presença de amônio, e o mutante mostrou ser capaz de expressar os genes de nitrogenase constitutivamente (McKINLAY e HARWOOD, 2010).

Outras proteobactérias possuem sistemas de regulação da atividade de NifA com algumas diferenças importantes em relação ao sistema de *A. brasilense*. Em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL através da formação de um complexo inativo em resposta a altas concentrações de oxigênio ou íons amônio (DIXON *et al.*, 1997). Para isso, em condições inapropriadas para a fixação de nitrogênio, NifL inibe a atividade de ATPase do domínio central de NifA necessária para a formação do complexo aberto pela  $\sigma^{54}$ -RNA polimerase. Com o intuito de identificar variantes de NifA insensíveis ao controle negativo por NifL em resposta aos níveis de amônio, Reyes-Ramirez e colaboradores (2002) isolaram mutações nos domínios N-terminal (GAF) e central (AAA+) de NifA de *A. vinelandii*. Dentre as mutações obtidas, algumas geraram variantes de NifA com atividade constitutiva e pouco responsiva à NifL em condições de alto amônio, apresentando atividade similar à atividade de NifA na ausência de NifL. Uma destas mutações (E356K), quando

introduzida no genoma de *A. vinelandii*, conferiu à bactéria a capacidade de excretar amônio (BATISTA *et al.*, 2021).

## 1.6 Regulação pós-traducional da nitrogenase

Além do controle transcricional da expressão dos genes *nif* mediado por NifA e das complexas cascatas de transdução de sinal que acoplam os processos de fixação de nitrogênio e assimilação de amônio, o controle pós-traducional da atividade da nitrogenase tem sido estudado em uma gama de diazotrofos e fornece um mecanismo rápido e reversível pelo qual os microrganismos podem responder a mudanças transitórias no ambiente (HUERGO *et al.*, 2012). Pelo menos três mecanismos diferentes envolvendo as proteínas PII são conhecidos por desligar/religar o complexo da nitrogenase em proteobactérias, em um processo denominado “switch off/switch on” (HUERGO *et al.*, 2012).

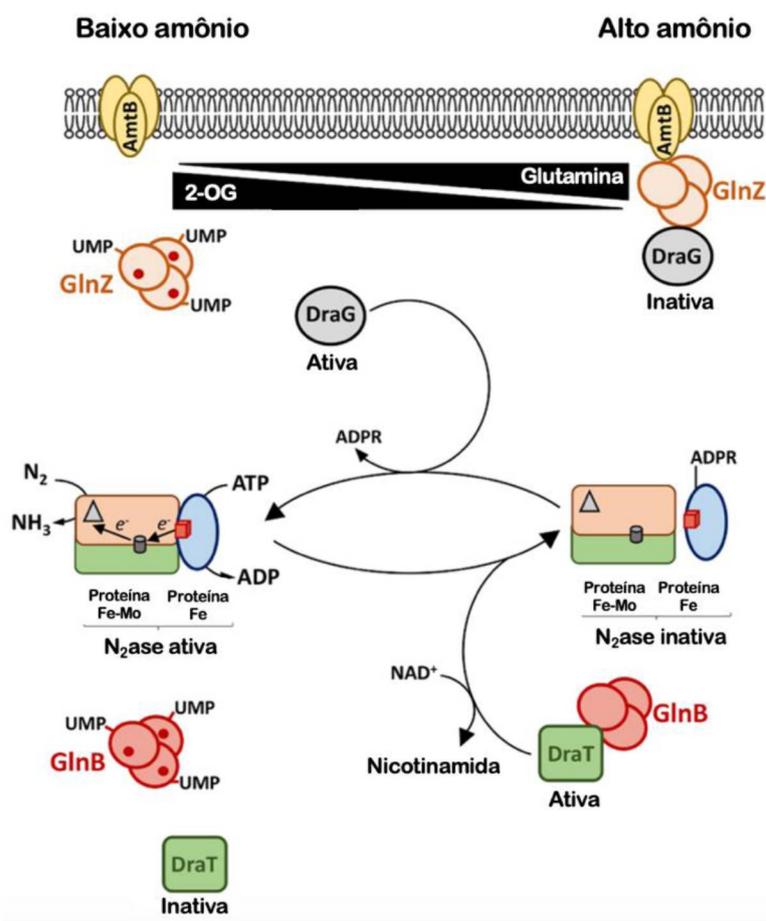
O mecanismo mais bem caracterizado de regulação pós-traducional da nitrogenase ocorre através da ADP-ribosilação da dinitrogenase redutase, que impede a associação da mesma com a dinitrogenase, inibindo, portanto, os ciclos de transferência de elétrons. Em *A. brasilense*, onde esse processo foi mais bem caracterizado, essa reação é catalisada pela enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT), que possui massa molecular de cerca de 33 kDa e catalisa a transferência de um grupo ADP-ribosil para um resíduo de arginina (Arg101) de uma subunidade de NifH a partir de uma molécula de NAD<sup>+</sup> em condições de excesso de amônio, levando à sua inativação. Um segundo componente desse sistema é a enzima dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG), que possui cerca de 32 kDa e é responsável por catalisar a hidrólise do grupo modificante da proteína NifH quando os níveis de amônio estão baixos (ZHANG, BURRIS e ROBERTS, 1992; HUERGO *et al.*, 2012).

Em *A. brasilense*, os genes *draT* e *draG* são expressos constitutivamente e compõem um operon (*draTG*) localizado cerca de 1,9 Kb à montante e divergentemente orientado em relação ao operon *nifHDK*. Análises de mutações introduzidas na região de *draT* mostraram que os mutantes produzidos eram incapazes de regular a atividade da nitrogenase em resposta aos níveis de amônio. Em contraste, a inserção de mutação no gene *draG* resultou em uma estirpe com atividade de ADP-ribosilação inalterada, mas incapaz de recuperar a atividade da dinitrogenase após a exaustão de amônio (ZHANG, BURRIS e ROBERTS, 1992).

De modo semelhante à regulação transcricional envolvendo as proteínas NifA e NtrC, as enzimas DraT e DraG também tem suas atividades moduladas por PII. De acordo com modelo proposto em *A. brasilense*, mediante condições de excesso de nitrogênio, a assimilação de amônio pela via GS-GOGAT aumenta os níveis de glutamina intracelular, com a concomitante diminuição da concentração de 2-OG. Nessas condições, a atividade UR de GlnD

permite que GlnB não uridililada (e ligada a ADP) interaja com DraT, estimulando a modificação de NifH. Em paralelo, GlnZ não uridililada interage com AmtB e DraG através da formação de um complexo ternário que permite o bloqueio do transporte de amônio e inativação de DraG. Alternativamente, quando os níveis de amônio estão baixos, GlnB e GlnZ encontram-se completamente uridililadas no citoplasma e presumivelmente saturadas com ATP e 2-OG, sendo incapazes de formar complexos com DraT e DraG, respectivamente. Nessas condições, DraT é inativa, enquanto DraG é ativa e promove a remoção do grupo modificante de NifH, reativando a nitrogenase (HUERGO *et al.*, 2006; MOURE *et al.*, 2013) (Figura 8).

**Figura 8 - Regulação do complexo da nitrogenase por DraT e DraG via interação com PII e AmtB em resposta a amônio**



Quando os níveis de amônio estão baixos na célula (porção esquerda da figura), GlnB e GlnZ encontram-se uridililadas e saturadas com ATP e 2-OG, não complexadas a DraT e DraG, respectivamente. Nessas condições, DraT é inativa, enquanto DraG encontra-se disponível no citoplasma permitindo a manutenção da proteína ferro em sua forma não-modificada. Mediante choque por amônio (porção direita da figura), altos níveis de glutamina levam à desuridililação de PII, as quais passam a ligar ADP. Nessas condições, GlnZ promove o sequestro da DraG pela interação com AmtB, bloqueando o fluxo de amônio e inativando DraG. Em paralelo, DraT é ativa pela interação com GlnB, e passa a catalisar a transferência de um grupo ADP-ribosil a um resíduo de arginina (Arg101) de uma subunidade da proteína Fe, interrompendo o fluxo de elétrons até o componente catalítico do complexo da nitrogenase. Adaptado de BATISTA e DIXON (2019).

## 1.7 Manipulação de organismos diazotróficos para excreção de amônio

Conforme discutido nas seções anteriores, a extensa rede regulatória envolvendo a expressão e controle dos componentes relacionados à FBN garante um forte acoplamento dos processos de fixação de nitrogênio e assimilação de amônio nas estirpes selvagens, de modo a evitar demandas energéticas que não sejam relacionadas às necessidades fisiológicas da própria bactéria. Por esse motivo, a liberação de nitrogênio fixado para o ambiente torna-se limitada, dificultando o uso desses organismos como provedores de amônio para a planta. Nesse sentido, a compreensão das hierarquias de regulação do metabolismo do nitrogênio nesses organismos torna-se uma ferramenta crucial para a engenharia metabólica de diazotrofos com capacidade superior de fixação e liberação de nitrogênio para promoção do crescimento vegetal. Os alvos imediatos para atingir este objetivo incluem, ao menos: 1) o regulador central da transcrição dos genes *nif* (por exemplo, através da inserção de mutações ativadoras nas regiões promotora e/ou codificadora dos genes *nifA* ou *nifL*, de modo a obter-se grandes quantidades de NifA expressa e ativa de forma independente dos níveis de amônio ou de ativação por PII); 2) enzimas envolvidas na regulação pós-traducional da nitrogenase (por exemplo, através da perturbação dos componentes DraT e DraG envolvidos nos mecanismos de desligamento/religamento da nitrogenase a depender do *status* de nitrogênio na célula); 3) enzimas envolvidas com as vias de assimilação de amônio (por exemplo, através da mutagênese direta das enzimas GS e GOGAT ou então dos componentes de modificação pós-traducional que levam à adenililação e inativação de GS, como ATase/AR e UTase/UR); 4) transportadores de amônio (por exemplo, através da mutagênese de AmtB).

Nas últimas décadas tem sido descrito algumas estratégias de edição de bactérias diazotróficas visando alguns dos alvos supramencionados com o intuito de aumentar a eficiência de fixação de nitrogênio e/ou transferência de nitrogênio fixado para a planta. No contexto da inativação do controle da expressão dos genes *nif* mediada por NifA-NifL, Bali e colaboradores (1992) mostraram que estirpe de *A. vinelandii* contendo interrupção do gene *nifL* não apresentava regulação negativa da FBN em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular, sendo possível detectar os mesmos níveis de atividade de nitrogenase mediante cultivo sob condições diazotróficas ou na presença de 15 mM de NH<sub>4</sub>Cl, bem como excreção de altas quantidades de amônio (em torno de 10 mM) para o meio de cultivo. Paralelamente a isto, Ortiz-Marquez e colaboradores (2012) mostraram que mutante do mesmo gene e espécie bacteriana expressava os genes estruturais da nitrogenase constitutivamente e era capaz de excretar amônio até dez vezes mais quando comparado à estirpe selvagem. Ainda neste contexto, Batista e colaboradores (2021) mostraram que a substituição E356K em NifA foi

capaz de perturbar a hierarquia de regulação dos genes *nif* via NifA-NifL em resposta ao status de carbono e nitrogênio em *A. vinelandii*, permitindo super-expressão da nitrogenase e excreção de altos níveis de amônio a depender da fonte de carbono empregada no meio de cultivo.

No que diz respeito ao transporte de amônio/metilamônio via AmtB, alguns poucos casos relatados na literatura correlacionam mutação do gene *amtB* com produção de fenótipo de excreção de amônio e, nos casos em que ocorre, são a níveis muito inferiores quando comparados às mutações que envolvem reguladores transcricionais da FBN ou genes relacionados às vias de assimilação de amônio. Um exemplo é a mutação de *amtB* inserida no genoma de *A. vinelandii* descrita por Barney e colaboradores (2015), que resultou em excreção de amônio a níveis micromolares (inferior a 10  $\mu$ M) e contribuição de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em meio de cultura suplementado com sacarose. Outro exemplo foi relatado em *Pseudomonas stutzeri*, onde a deleção dupla dos genes *amtB1* e *amtB2* resultou em estirpe com perda somente parcial de atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio como resultado da expressão desregulada dos genes *nifA* e *nifH*, e excreção de amônio a níveis micromolares (em torno de 10  $\mu$ M) (ZHANG *et al.*, 2012).

No âmbito da inibição parcial de GS ou GOGAT para assimilação deficiente de amônia, Machado e colaboradores (1991) mostraram que estirpes de *A. brasilense* resistentes ao composto etilenodiamina eram capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio a níveis milimolares (aproximadamente 3,5 mM), além de apresentarem atividades biossintética e transferásica de GS intrinsecamente mais baixas em relação à sua estirpe parental. De semelhante modo, Ortiz-Marquez e colaboradores (2014) relataram que estirpe de *A. vinelandii* contendo uma mutação pontual no sítio ativo de GS (*glnA* D49S) exibia penalidade moderada no crescimento sob condições diazotróficas e fenótipo de excreção de amônio (até 1,7 mM). Por outro lado, quando combinada à deleção de *nifL*, a mutação *glnA* D49S gerou uma estirpe com um pior *fitness* de crescimento e, embora apresentasse uma taxa inicial aumentada de liberação de amônio no meio (ainda durante as fases lag e exponencial), a concentração máxima permaneceu em torno de 1 mM (ORTIZ-MARQUEZ *et al.*, 2014). Paralelamente a isto, Ambrosio e colaboradores (2017) mostraram altos níveis de acúmulo de amônio (até 22 mM) por estirpes mutantes de *A. vinelandii* expressando *glnA* sob controle um promotor exogenamente induzível (*trcP-glnA*) e/ou contendo deleção de *nifL*, e incremento em peso de folha e raiz de cultivares de pepino mediante inoculação com as estirpes editadas *versus* plantas não inoculadas ou inoculadas com estirpe de *A. vinelandii* selvagem.

Em estudo de maior exploração de estratégias de engenharia metabólica visando múltiplos alvos relacionados à FBN, Bloch e colaboradores (2020b) conduziram uma série de mutações no genoma de estirpe de *Kosakonia sacchari* isolada a partir de raiz de milho. As

estratégias empregadas para edição genômica incluíam: interrupção de *nifL* com concomitante rearranjo intragenômico de promotor (Prm), visando expressão de *nifA* sob controle de promotor não-regulado por nitrogênio; truncagem da porção 5' do gene *glnE* responsável por codificar o domínio AR da proteína resultante; deleção de maior parte da região codificante de AmtB; deleção completa de *glnD*. Os resultados obtidos mostraram que a deleção de *nifL* combinada ao rearranjo intragenômico de promotor para expressão desregulada de *nifA* foi suficiente para gerar atividade constitutiva de nitrogenase e excreção de amônio. Além disso, a combinação adicional de mutações pela deleção completa e da porção 5' dos genes *glnD* e *glnE*, respectivamente, contribuiu para aumento dos fenótipos supramencionados. Por outro lado, a construção de estirpes com maior capacidade de excreção de amônio foi acompanhada por penalidade nas das taxas de crescimento e não foi observado efeito claro dos mutantes no aumento de produtividade de cultivares de milho durante estudo em campo (BLOCH *et al.*, 2020b).

Utilizando-se de ferramentas de engenharia metabólica, Schnabel e Sattely (2021a) demonstraram que a expressão de variantes unidirecionais de adenililtransferases truncadas no domínio N-terminal a partir de um circuito genético constitutivo inserido em um plasmídeo replicativo em estirpe mutante *glnE* de *A. brasilense* levou ao acúmulo de amônio em cultura a níveis milimolares, como resultado da adenililação constitutiva de GS e concomitante redução de sua atividade. Por outro lado, a expressão de uma dessas variantes (*EcGlnE*, N-truncada nos primeiros 422 resíduos de aminoácidos) a partir do mesmo circuito genético inserido no genoma de *A. brasilense* resultou em penalidade de crescimento severa e, mais importantemente, seleção evolucionária de mutantes contendo inserção de transposons, mutações pontuais e recombinação envolvendo o cassete de expressão, com reversão da capacidade de adenililação constitutiva de GS e excreção de amônio. Visando minimizar este efeito de reversão de fenótipo nas estirpes editadas, Schnabel e Sattely (2021b) utilizaram ainda de abordagem de redundância genética para a construção de mutantes contendo múltiplas cópias gênicas para expressão da mesma variante adenililtransferase unidirecional supramencionada, visando prolongamento da capacidade de excreção de amônio. Apesar da estratégia ter sido eficiente na extensão do período de excreção de amônio em até quatro vezes para as estirpes contendo redundância genética em relação àquela de cópia única, este efeito não foi traduzido proporcionalmente em maiores concentrações de amônio máximas atingidas ou em capacidade de promoção de crescimento vegetal. Em conjunção, estes resultados sugerem que a utilização de circuitos genéticos com sequências exógenas inseridas no genoma de *A. brasilense* podem aumentar a ocorrência de eventos de pressão evolutiva que levam à neutralização das mutações inseridas em genes-alvo e inviabilizam a longevidade de fenótipo de excreção de amônio. Além disso,

esses dados sugerem que um tempo mais longo de produção de amônio em cultura por estirpes contendo redundância genética é provavelmente compensado pelo estresse metabólico e fisiológico associado à alta expressão de várias cópias da variante adenililtransferase unidirecional, limitando o potencial das mesmas como promotoras do crescimento vegetal.

Levando em consideração a escassez de estirpes com fenótipo estável de fixação de nitrogênio constitutiva e excreção de amônio em cultura, com robustez em termos de colonização e transferência do nitrogênio fixado para culturas vegetais, bem como a necessidade emergente da implementação de alternativas mais sustentáveis à nutrição nitrogenada agrícola, este projeto de doutorado buscou cercar alguns dos pontos regulatórios supramencionados com o intuito de gerar estirpes de *A. brasilense* aprimoradas e com capacidade superior de fixação de nitrogênio atmosférico e excreção de amônio.

## 2 JUSTIFICATIVA

A rápida expansão da população do planeta nas últimas décadas tem intensificado a demanda pela produção agrícola e incentivado a busca de alternativas às estratégias já empregadas para obter ainda maior eficiência produtiva no futuro. O uso de fertilizantes químicos nitrogenados atingiu níveis não-sustentáveis e tem ocasionado a eutrofização de rios e lagos, emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera e diversos outros efeitos deletérios ao meio ambiente. O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de promover o crescimento vegetal tem sido apontado como uma solução a curto prazo para a crise do nitrogênio. Entretanto, à exceção de alfa rizóbios associados a leguminosas, os organismos diazotróficos não liberam grandes quantidades de amônio espontaneamente, e a transferência do nitrogênio fixado para o solo ocorre lentamente, tornando imediatamente disponível para a planta apenas uma pequena proporção da produção bacteriana. Nesse sentido, este estudo buscou o desenvolvimento de estirpes de *Azospirillum brasilense*, uma bactéria diazotrófica já utilizada como promotor de crescimento vegetal, que mostrassem maior atividade de fixação de nitrogênio e adquirissem a capacidade de excretar grandes quantidades de amônio. Buscou-se obter os fenótipos desejados através da perturbação dos circuitos genéticos regulatórios que acoplam fortemente os processos de fixação e assimilação de nitrogênio nas estirpes selvagens.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto consistiu em construir estirpes de *A. brasilense* capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio. A abordagem utilizada para tanto foi a introdução de mutações pontuais ou deleções específicas de genes importantes para regulação da assimilação de amônio e/ou da fixação biológica de nitrogênio.

#### 3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Construir variantes de NifA com as mutações pontuais Y18F, M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, e avaliar a capacidade destas proteínas de ativar uma fusão transcricional *nifH::lacZ* em *E. coli*;

3.2.2 Construir variantes de NifA contendo deleção de trechos específicos da região de interdomínios QL (resíduos 185-199 e 185-201) e avaliar a capacidade destas proteínas de ativar uma fusão transcricional *nifH::lacZ* em *E. coli*;

3.2.3 Construir plasmídeos expressando as variantes de NifA descritas nos itens 3.2.1 e 3.2.2 para serem utilizados em experimentos de complementação de mutantes *nifA*, *glnB* e *glnBglnZ* de *A. brasilense*;

3.2.4 Transferir para o genoma de *A. brasilense* as mutações pontuais que gerem proteínas NifA com atividade constitutiva;

3.2.5 Construir e caracterizar uma estirpe de *A. brasilense* contendo deleção cromossomal da porção 5' do gene *nifA*;

3.2.6 Construir e caracterizar uma estirpe de *A. brasilense* contendo deleção cromossomal do gene *draT*;

3.2.7 Construir e caracterizar uma estirpe de *A. brasilense* contendo deleção cromossomal da região 5' do gene *glnE*, que codifica o domínio N-terminal (AR) de GlnE;

3.2.8 Construir e caracterizar uma estirpe de *A. brasilense* contendo mutações específicas no gene *glnD* que codifiquem as mutações pontuais H552A e D553A em GlnD;

3.2.9 Transferir a mutação pontual na posição 1040 do gene *glnA* (que codifica a mutação P347L em GlnA) da estirpe excretora de amônio HM053 para a estirpe selvagem FP2 de *A. brasilense*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias e Plasmídeos

Na tabela 1 estão descritas as estirpes de *E. coli* e *A. brasilense* utilizadas neste estudo.

**Tabela 1 - Estirpes de bactérias utilizadas**

Estirpe	Características	Referência
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
TOP10	<i>F mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mcrH-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda$ <i>rpsL mupG</i> $\lambda$ (Sm <sup>R</sup> )	Invitrogen
S17.1	Tra <sup>+</sup> (Sm <sup>R</sup> )	SIMON <i>et al.</i> , 1983
ET8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutC<sub>K</sub></i> (Nal <sup>R</sup> )	MacNEIL <i>et al.</i> , 1982
JM109 ( $\lambda$ DE3)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44</i> <i>relA1</i> $\lambda$ - <i>A</i> ( <i>lac-proAB</i> ) [ <i>F'</i> <i>traD36 proAB</i> <i>lacI<sup>f</sup>ZAM15</i> ] $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07</i> <i>ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] (Nal <sup>R</sup> )	Origem incerta; derivada de JM109 (YANISCH- PERRON, VIEIRA e MESSING, 1985)
<b><i>Azospirillum brasilense</i></b>		
FP2	Nif <sup>+</sup> , derivado de Sp7 com resistência espontânea a antibióticos (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	PEDROSA e YATES, 1984
HM053	Nif <sup>c</sup> , FP2 <i>glnA</i> * (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	MACHADO <i>et al.</i> , 1991
LFH3	Nif <sup>f</sup> , $\Delta$ <i>glnB</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	HUERGO <i>et al.</i> , 2006
7628	Nif <sup>f</sup> , Sp7 <i>glnB::km</i> (Nal <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	DE ZAMAROCZY <i>et al.</i> , 1996
2812	Nif <sup>f</sup> , Sp7 <i>glnB::km glnZ::<math>\Omega</math></i> (Nal <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	DE ZAMAROCZY <i>et al.</i> , 1998
FP2 $\Delta$ <i>nifA</i>	Nif <sup>f</sup> , FP2 $\Delta$ <i>nifA</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
LFH3 $\Delta$ <i>nifA</i>	Nif <sup>f</sup> , FP2 $\Delta$ <i>glnB</i> $\Delta$ <i>nifA</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ GAF-NifA	Nif <sup>f</sup> , FP2 $\Delta$ GAF-NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i>	Nif <sup>+</sup> , FP2 $\Delta$ <i>draT</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>nifA</i> $\Delta$ <i>draT</i>	Nif <sup>f</sup> , FP2 $\Delta$ <i>nifA</i> $\Delta$ <i>draT</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho

FP2-QL2-NifA	FP2 contendo uma deleção cromossomal <i>in frame</i> da região que codifica os resíduos 185-201 de NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2-Y18F+M162V-NifA	FP2 contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam as substituições Y18F e M162V em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2-M162V-NifA	FP2 contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M162V em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2-E350K-NifA	FP2 contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição E350K em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2-V177G-NifA	FP2 contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição V177G em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2-M185P-NifA	FP2 contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M185P em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2-M191P-NifA	FP2 contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M191P em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -QL2-NifA	FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo uma deleção cromossomal <i>in frame</i> da região que codifica os resíduos 185-201 de NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -Y18F+M162V-NifA	FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam as substituições Y18F e M162V em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -M162V-NifA	FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M162V em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -E350K-NifA	Nif, FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição E350K em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -V177G-NifA	FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição V177G em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -M185P-NifA	FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M185P em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 $\Delta$ <i>draT</i> -M191P-NifA	FP2 $\Delta$ <i>draT</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M191P em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho

<i>glnAP347L</i>	Nif <sup>C</sup> , FP2 contendo substituições no gene <i>glnA</i> que codificam a substituição P347L em GlnA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>glnAP347LΔnifA</i>	Nif <sup>-</sup> , <i>glnAP347L ΔnifA</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>glnAP347LΔdraT</i>	<i>glnAP347L ΔdraT</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>glnAP347L-V177G-NifA</i>	<i>glnAP347L</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição V177G em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>glnAP347L-M185P-NifA</i>	<i>glnAP347L</i> contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição M185P em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2Δ <i>NglnE</i>	Nif <sup>+</sup> , FP2 contendo uma deleção cromossomal <i>in frame</i> da região do gene <i>glnE</i> que codifica os resíduos 2-455 de GlnE (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2 <i>glnD</i> *	Nif <sup>+</sup> , FP2 contendo substituições no gene <i>glnD</i> que codificam as substituições H552A e D553A em GlnD (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2Δ <i>NglnEglnD</i> *	Nif <sup>C</sup> , FP2Δ <i>NglnE</i> contendo substituições no gene <i>glnD</i> que codificam as substituições H552A e D553A em GlnD (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2Δ <i>NglnEglnDΔnifA</i>	Nif <sup>-</sup> , FP2Δ <i>NglnEglnD</i> * Δ <i>nifA</i> (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
FP2Δ <i>NglnEglnD</i> *-V177G-NifA	FP2Δ <i>NglnEglnD</i> * contendo substituições no gene <i>nifA</i> que codificam a substituição V177G em NifA (Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho

Na tabela 2 estão listados os plasmídeos utilizados neste estudo.

**Tabela 2 - Plasmídeos utilizados**

Plasmídeos	Características	Referência
pJET1.2	Vetor de captura para clonagem <i>blunt</i> de produto de PCR contendo promotor T7 para expressão (Amp <sup>R</sup> )	Invitrogen
pRT22	Contém a fusão tradicional <i>nifH</i> ( <i>K. pneumoniae</i> ): <i>lacZ</i> (Cm <sup>R</sup> )	TULI e MERRICK, 1988
pET28a	Vetor para expressão a partir do promotor T7. Expressa a proteína com uma fusão His-tag N-terminal (Km <sup>R</sup> )	Novagen

pLAFR3.18	Vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R (Tc <sup>R</sup> )	MACHADO <i>et al.</i> , 1995
pMBCRISPR-1	Vetor contendo elementos CRISPR para edição genômica e sítio <i>XbaI</i> único para adição de insertos (Km <sup>R</sup> )	Marcelo Bueno Batista, não publicado
pMB18424	Vetor suicida mobilizável contendo cassete <i>sacB::Tc</i> para seleção negativa (Tc <sup>R</sup> )	Marcelo Bueno Batista, não publicado
pK18mobsacB	Vetor suicida mobilizável contendo cassete <i>sacB::Km</i> para seleção negativa (Km <sup>R</sup> )	SCHAFFER <i>et al.</i> , 1994
pPR34	Contém o operon <i>nifLA</i> de <i>A. vinelandii</i> traduzido a partir do RBS natural de <i>nifL</i> clonado em pT7-7(Amp <sup>R</sup> )	SODERBACK <i>et al.</i> , 1998
pPMA	Contém um fragmento que expressa NifL nativa e NifA com a mutação E356K de <i>A. vinelandii</i> clonado em pPR34 (Amp <sup>R</sup> )	REYES-RAMIREZ <i>et al.</i> , 2002
pTMA11	Contém o gene que codifica a variante N-truncada ( $\Delta 2-202$ ) de NifA de <i>A. brasilense</i> clonado em pET28a (Km <sup>R</sup> )	APOLONIO, 2018
pTMA12	Contém o gene <i>nifA</i> N-truncado ( $\Delta 2-202$ ) de <i>A. brasilense</i> clonado em pLAFR3.18 (Tc <sup>R</sup> )	APOLONIO, 2018
pTMA1401	Contém o gene e o promotor nativo (-540 – -1) de <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonados em pJET1.2/ <i>blunt</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1402	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M162V sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1403	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação E350K sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1404	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação V177G sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1405	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M185P sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho

---

pTMA1406	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M191P sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1501	Contém o gene <i>nifA</i> nativo de <i>A. brasilense</i> clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1502	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M162V (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1503	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação E350K (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1504	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação V177G (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1505	Contém um fragmento clonado em pJET1.2/ <i>blunt</i> que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M191P (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1601	Contém o gene <i>nifA</i> nativo de <i>A. brasilense</i> clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1602	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação Y18F clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1603	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com as mutações Y18F e M162V clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1604	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> truncada entre os resíduos 185-199 clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1605	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> truncada entre os resíduos 185-201 clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho

---

---

pTMA1606	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M162V clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1607	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação E350K clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1608	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação V177G clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1609	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M185P clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1610	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M191P clonado em pPR34 após remoção dos genes <i>nifAL</i> de <i>A. vinelandii</i> , utilizando a técnica de Gibson Assembly (Amp <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1701	Contém o gene <i>nifA</i> nativo de <i>A. brasilense</i> clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1702	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação Y18F clonado <i>NdeI/HindIII</i> em pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1703	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com as mutações Y18F e M162V clonado <i>NdeI/HindIII</i> em pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1704	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> truncada entre os resíduos 185-199 clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1705	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> truncada entre os resíduos	Este trabalho

---

---

	185-201 clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	
pTMA1706	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M162V clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1707	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação E350K clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1708	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação V177G clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1709	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M185P clonado <i>NdeI/HindIII</i> em pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1710	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M191P clonado <i>NdeI/HindIII</i> em vetor pET28a (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1801	Contém o gene e o promotor de <i>nifA</i> nativos de <i>A. brasilense</i> clonados <i>SacI/HindIII</i> no vetor pLAFR.3.18 (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1802	Contém um fragmento clonado <i>SacI/HindIII</i> em pLAFR3.18 que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M162V sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1803	Contém um fragmento clonado <i>SacI/HindIII</i> em pLAFR3.18 que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação E350K sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1804	Contém um fragmento clonado <i>SacI/HindIII</i> em pLAFR3.18 que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação V177G sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1805	Contém um fragmento clonado <i>SacI/HindIII</i> em pLAFR3.18 que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação	Este trabalho

---

---

	M185P sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Tc <sup>R</sup> )	
pTMA1806	Contém um fragmento clonado <i>SacI/HindIII</i> em pLAFR3.18 que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M191P sob controle do promotor nativo de <i>nifA</i> (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1901	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> retirado de pTMA1701 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido no vetor pLAFR.3.18 (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1902	Contém um fragmento retirado de pTMA1702 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação Y18F (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1903	Contém um fragmento retirado de pTMA1703 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com as mutações Y18F e M162V (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1904	Contém um fragmento retirado de pTMA1705 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> truncada entre os resíduos 185-201 (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1905	Contém um fragmento retirado de pTMA1706 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M162V (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1906	Contém um fragmento retirado de pTMA1707 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação E350K (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1907	Contém um fragmento retirado de pTMA1708 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação V177G (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1908	Contém um fragmento retirado de pTMA1709 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M185P (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA1909	Contém um fragmento retirado de pTMA1710 com <i>XbaI/HindIII</i> e inserido	Este trabalho

---

---

	em pLAFR3.18; expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a mutação M191P (Tc <sup>R</sup> )	
pTMA2001	Contém um fragmento de ~2,3 kb, com a região <i>nifA</i> UP (-1018 – 71) fusionada à <i>nifA</i> DOWN (1763 – 2947), clonado no vetor pMBCRISPR-1 <i>blunt</i> linearizado no sítio <i>XbaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2002	Contém um fragmento de ~2,3 kb, com a região <i>nifA</i> UP (-1018 – 71) fusionada à <i>nifA</i> DOWN (1763 – 2947), clonado no vetor pMB18424 <i>blunt</i> linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Tc <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2003	Contém um fragmento <i>XbaI/HindIII</i> de ~2,3 kb, com a região <i>nifA</i> UP (-1018 – 71) fusionada à <i>nifA</i> DOWN (1763 – 2947), clonado no vetor pK18mobsacB entre os sítios <i>XbaI</i> e <i>HindIII</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA21	Contém fragmento de ~1,8 kb, com a região GAF- <i>nifA</i> UP (-837 – 3) fusionada à GAF- <i>nifA</i> DOWN (607 – 1560), clonado no vetor pK18mobsacB <i>blunt</i> linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA22	Contém fragmento de ~1,9 kb, com a região <i>draT</i> UP (-838 – 90) fusionada à <i>draT</i> DOWN (871 – 1809), clonado no vetor pK18mobsacB <i>blunt</i> linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA23	Contém o gene <i>glnA</i> com a substituição C1040T clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2401	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com as substituições Y18F e M162V clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2402	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> truncada entre os resíduos 185-201 clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB <i>blunt</i> linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2403	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a substituição M162V clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2404	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a substituição E350K	Este trabalho

---

---

	clonado no vetor pK18mobsacB <i>blunt</i> linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	
pTMA2405	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a substituição V177G clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2406	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a substituição M185P clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2407	Contém um fragmento que expressa NifA de <i>A. brasilense</i> com a substituição M191P clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA25	Contém um fragmento de ~2,7 kb, com a região N- <i>glnE</i> UP (-905 – 3) fusionada à N- <i>glnE</i> DOWN (1366 – 3093), clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2601	Contém um fragmento que expressa GlnD de <i>A. brasilense</i> com as substituições H552A e D553A clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
pTMA2602	Contém um fragmento que expressa GlnD de <i>A. brasilense</i> com as substituições H552A e D553A e destruição de sítio <i>SacII</i> (C1674G), clonado <i>blunt</i> no vetor pK18mobsacB linearizado no sítio <i>SmaI</i> (Km <sup>R</sup> )	Este trabalho

---

## 4.2 Antibióticos

Os antibióticos e suas respectivas concentrações utilizados nesse estudo estão descritos na Tabela 3 e foram adicionados aos meios de culturas de acordo com a resistência das estirpes ou plasmídeos utilizados.

**Tabela 3 - Concentrações de antibióticos utilizados nos cultivos**

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>A. brasilense</i>
Ácido Nalidíxico (NaI)	5 µg/mL	10 µg/mL
Carbenicilina (Cb)	50 µg/mL	-
Canamicina (Km)	50 µg/mL	100 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	15 µg/mL	-
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL	80 µg/mL
Tetraciclina (Tc)	5 µg/mL	1-5 µg/mL

### 4.3 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias

#### 4.3.1 Meios empregados para cultivo de *A. brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas rotineiramente a 30°C em meio NFb, conforme descrito por MACHADO e colaboradores (1991) com poucas modificações (Tabela 4 – Composição de meio NFb). Antibióticos foram adicionados ao meio conforme as exigências de cada estirpe e de cada experimento, conforme descrito na Tabela 3. O meio NFb foi sempre acrescido de uma fonte de carbono (soluções de ácido láctico ou ácido málico preparadas à parte na concentração de 100 g/L, e adicionadas ao meio no momento do uso para uma concentração final de 5 g/L) e de uma fonte de fosfato, que consiste em uma solução estoque de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  80 g/L e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  120 g/L, denominada solução de fosfatos 20X, adicionada ao meio de cultivo para uma concentração final de 1X ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6 g/L), formando o meio NFbHP, ou 0,1X ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 g/L e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6 g/L), formando o meio NFbLP.

**Tabela 4 - Composição do meio Nfb**

Elemento	Concentração
10% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mL/L
10% NaCl	1 mL/L
1% $\text{CaCl}_2$	2 mL/L
1,64% Fe.EDTA	4 mL/L
200 µg/mL Solução de Biotina	0,5 mL/L
Solução de Microelementos*	10 mL/L

\*A solução de microelementos era composta de uma mistura de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,175 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1,4 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,04 g/L e  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,12 g/L.

Como fonte de nitrogênio foi utilizada solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1M para as concentrações finais de 10 mM e 20 mM (condições de alto amônio), e os meios resultantes foram denominados NFbHPN-lactato ou NFbHPN-malato, os quais foram usados para a maior parte dos cultivos rotineiros de *A. brasilense* em meio líquido. Alternativamente, foram utilizadas soluções estoque de glutamato 1 M ou glutamina 0,2 M para concentração final de 0,5 mM (condições de baixo amônio), sendo o meio resultante denominado NFbPLN. As soluções de fosfatos, cloreto de amônio, glutamato e glutamina foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso.

Os meios NFbHP-lactato ou NFbHP-malato sólidos foram obtidos adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido, bem como dez por cento da mistura de fosfatos (concentrações finais  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6 g/L e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 g/L), a fim de evitar-se hidrólise do ágar devido a possíveis variações no pH. Os meios NFbHPN-lactato e NFbHPN-malato sólidos, por sua vez, foram obtidos através da adição de 20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aos meios NFbHP-lactato e NFbHP-malato, respectivamente. O meio NFbHP semi-sólido foi obtido através da mistura no momento do uso dos meios NFbHP líquido e NFbHP sólido na proporção de 89:11, respectivamente, ambos aquecidos à mesma temperatura e ambos suplementados com o mesmo ácido orgânico (ácido lático ou ácido málico).

#### 4.3.2 Meios empregados para cultivo de *E. coli*

Para cultivo das estirpes de *Escherichia coli* em meio líquido foram utilizados os meios *Lysogeny Broth* (LB), L, SOC e NFDM. Os cultivos rotineiros em meio líquido foram realizados em meio LB a 37°C sob agitação de 250 rpm em incubadora rotativa (*shaker*).

O meio LB foi preparado de acordo com Miller (1972) e apresentava a seguinte composição:

**Tabela 5 - Composição do meio LB**

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

O meio sólido (LA) foi obtido adicionando-se ágar na concentração de 15 g/L ao meio LB.

O meio L, utilizado para o cultivo de *E. coli* para ensaios de  $\beta$ -galactosidase, apresentava a seguinte composição:

**Tabela 6 - Composição do meio L**

Elemento	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Glucose	1 g/L

O meio SOC (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizado para a recuperação celular depois da transformação de plasmídeos, apresentava a seguinte composição:

**Tabela 7 - Composição do meio SOC**

Elemento	Concentração
Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Glucose	3,6 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,186 g/L
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,03 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,46 g/L

Para os ensaios de determinação de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi utilizado o meio mínimo NFD (CANNON *et al.*, 1974), o qual apresentava a seguinte composição:

**Tabela 8 - Composição do meio NFD**

Elemento	Concentração
MgSO <sub>4</sub>	0,1 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,025 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025 g/L
D-glucose	20 g/L

O meio final era obtido pela adição de uma mistura de fosfatos preparada separadamente 20X concentrada (solução estoque  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  68,0 g/L e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  241,2 g/L) e adicionada ao meio de cultivo no momento do uso para uma concentração final de 1X ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,4 g/L e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12,06 g/L). Como fonte de nitrogênio foi utilizada solução de 2% de caseína hidrolisada para a concentração final de 0,02% (condição de baixo amônio) ou solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1M para a concentração final de 7,56 mM (condição de alto amônio). Além disso, quando necessário, foi feita suplementação com diferentes concentrações do indutor IPTG, conforme descrito em cada experimento.

#### 4.3.3 Estoque de linhagens de bactérias

As estirpes de *E. coli* e *A. brasilense* foram estocadas em glicerol 50% a  $-20^\circ\text{C}$  de modo semelhante. Para isso, 1,5 mL de uma cultura saturada de *E. coli* ou *A. brasilense* foi submetido à centrifugação a 13.500 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 500  $\mu\text{L}$  de glicerol 50% e os tubos foram estocados. Além disso, as estirpes de *A. brasilense* também foram estocadas em frascos de vidro com tampa rosqueável contendo meio NFbHPN-lactato solidificado inclinado, à temperatura ambiente.

#### 4.3.4 Cultivo de *A. brasilense* para registro de curvas de crescimento

Inicialmente as estirpes foram crescidas em meio 3 mL de meio NFbHPN-lactato líquido *overnight* a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm com 20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e os antibióticos apropriados. Após o período de incubação, as culturas foram usadas para inocular 500  $\mu\text{L}$  de meio NFbHPN-lactato líquido (20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para uma D.O.<sub>600nm</sub> inicial igual a 0,05. Para os experimentos em que se desejou avaliar o efeito da adição de glutamina sob o crescimento de mutantes excretores, o meio foi suplementado de diferentes concentrações de glutamina, conforme indicado nos resultados de cada experimento. As curvas de crescimento foram feitas utilizando um leitor de microplaca de parâmetros controláveis (Tecan Infinite M200) por cerca de 48 horas, após determinadas as condições ideais de temperatura e aeração. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos a partir dos pontos que compõem as fases lag e exponencial das curvas de crescimento, respectivamente, e calculados por meio da equação e  $R^2$  gerados pela função de ajuste de curva exponencial ( $Y=Ae^{Bx}$ ) em Microsoft Excel e da relação  $Td = \ln(2)/B$ .

## 4.4 Métodos *in silico*

### 4.4.1 Alinhamento de sequências de DNA e proteína

As sequências dos genes de *A. brasilense* de interesse deste estudo foram obtidas do genoma sequenciado da estirpe FP2 pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN) da UFPR (GenBank *assembly accession*: GCA\_000404045.1; RefSeq *assembly accession*: GCF\_000404045.1), e a partir destas, a sequência de aminoácidos de proteínas foi obtida por tradução *in silico* usando o código genético padrão. Sequências gênicas ou proteicas similares de outros organismos foram obtidas do banco de dados de sequências não-redundantes do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990). As sequências foram analisadas no programa MEGAX (KUMAR *et al.*, 2018) ou SnapGene (Dotmatics) e alinhadas com o algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994), em condições descritas para cada experimento. Sequências obtidas de reações de sequenciamento de DNA para a confirmação de construções plasmidiais e mutantes foram observadas e comparadas com a sequência original apropriada também usando o programa MEGAX. Para o planejamento de construções plasmidiais, as sequências gênicas foram depositadas no programa SnapGene, de onde foram obtidas as simulações de amplificação e clonagem de fragmentos, bem como simulações de digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose. Além disso, as figuras dos vetores construídos neste estudo também foram obtidas deste último.

### 4.4.2 Desenho de oligonucleotídeos

Os *primers* utilizados neste trabalho foram planejados majoritariamente utilizando o programa SnapGene (Dotmatics) e as ferramentas OligoAnalyser (Integrated DNA Technologies - IDT) e NEBuilder Assembly (New England Biolabs – NEB). Os pares de oligonucleotídeos foram desenhados de modo a apresentar temperaturas de anelamento semelhantes e não acima de 72°C. Além disso, as sequências foram analisadas quanto à possível formação de autodímeros envolvendo as extremidades 3' e grampos de estrutura secundária indesejáveis. Sítios de restrição foram adicionados às sequências de alguns *primers* a fim de facilitar a clonagem dos produtos de PCR obtidos nos vetores de interesse. Exclusivamente para os experimentos de RT-qPCR, os *primers* foram planejados utilizando a ferramenta Primer-BLAST (NCBI). Os parâmetros empregados visavam obter oligonucleotídeos de tamanho entre 18-22 pb, temperatura de anelamento entre 60-64°C e que gerassem produtos entre 95-105 pb. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reações de amplificação neste estudo encontram-se na Tabela 9. Regiões sublinhadas e destacadas em negrito representam os sítios de restrição inseridos e os códons alterados, respectivamente.

Tabela 9 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo

Nome	Sequência (5'→3')
nifA_prom_FOR	AAGTAGAGCTCGAGCGTGCCCTTG
nifA_prom_REV	GGACTCTAGACGCCGCGCA
nifA_FOR_2	GCGGCATATGGAGTCCCAGTTGA
nifA_M162V_REV	GTTGGCGACCACGGTCAGGAA
nifA_M162V_FOR	TTCCTGACCGTGGTCGCCAAC
nifA_REV	ACTGATAAGCTTGCTGTCGCCCG
nifA_E350K_FOR	CTGAACCTGAAGGAGGCGGTC
nifA_E350K_REV	GACCGCCTCCTTCAGGTTTCAG
nifA_V177G_FOR	CACCGCACCGGGGCCGAGGAG.
nifA_V177G_REV	CTCCTCGGCCCCGGTGCGGTG
nifA_M185P_FOR	GCTTCATGCCGCGGGAGAC
nifA_M185P_REV	GTCTCCCGCGGCATGAAGC
nifA_M191P_FOR	GACCTTCCGCCCGCAGAAGGAGC
nifA_M191P_REV	GCTCCTTCTGCGGGCGGAAGGTC
Ab-nifA-del-down3b_fwd	GCAAGATCCTGGGCGATGGAGCGCACCG
Ab-nifA-del-down_rev	CATTCAAATATGTATCCGCTCATGTATGACAGTATCGGGTGTAG
Ab-nifA-del-UP_fwd	ATATTTTAGATGAAGATTATTTCTTAATTCATGACGGCGACCCCTCC
Ab-nifA-del-UP4_rev	TCCATCGCCCAGGATCTTGCTGACCTCATAGATG
Ab-nifA-del-UP+Down_fwd	ATATCGAATTCCTGCAGCCCTCATGACGGCGACCCCTCC
Ab-nifA-del-UP+Down_rev	CTAGAACTAGTGGATCCCCCATGACAGTATCGGGTGTAGCG
Ab-delta-B-up_fwd	GGATAGACGAGGCACCATATGCCGGGTGCAATGCGC
Ab-delta-B-up_rev	TGATCGGGGCCATGAAGCGGCGCTCCTC
Ab-delta-B-down_fwd	CCGCTTCATGGCCCCGATCAACGACGTG
Ab-delta-B-down_rev	GCTTATCATCGATAAGCTTTCAGAAGCGCTTGATCTCG
Ab-B-del-2-up_rev	CGTCGTTGATCATGAAGCGGCGCTCCTC
Ab-B-del-2-down_fwd	CCGCTTCATGATCAACGACGTGGTCTGC
Av-RBS-34-backbone_fwd	ATGGTGCCTCGTCTATCCGAA
pPR34-backbone_rev	AAGCTTATCGATGATAAGCTG
Tyr18Phe_Fwd2	AGCAAGATCCTCGGTTCTCTCTCGAC
Tyr18Phe_Rev2	GACCTCGAAGATGGTCAGCAGTTCCAG
nifA-UP_fwd	CGAATTCGAGCTCGGTACCCAACTCCCCGCGCGCCATG
nifA-UP_rev	CCACGTCGTTTCATGATCGACACCCCCCTGCTC
nifA-DOWN_fwd	GTCGATCATGAACGACGTGGTCTGCACCAGCCCC
nifA-DOWN_rev	GTCGACTCTAGAGGATCCCCCGCGCAGGCCGCGCCACGC
draT-UP_Fwd	CGAATTCGAGCTCGGTACCCAGCAGAGCGTGGGCGAG
draT-UP_Rev	GCGACACCCCCGAACCGTCCGCCATCGC
draT-DOWN_Fwd	GGACGGTTCGGGGTGTGCTTCTCTGAC
draT-DOWN_Rev	GTCGACTCTAGAGGATCCCCTCACCCCTGCTTGAGCGC
glnA_fwd	CGAATTCGAGCTCGGTACCCTTTTGTGCTGTCACGTTGTGTG
glnA_rev	GTCGACTCTAGAGGATCCCCACCGCCTGAGGCATCTCTTC
glnD-UP_fwd	CGAATTCGAGCTCGGTACCCATGCTCTCCACCCGCGCCG

glnD-UP_rev	CCTTGGCGATGGCGGCCAGCAGCACGGC
glnD-DOWN_fwd	GCTGGCCCGCCATCGCCAAGGGCCGCGGC
glnD-DOWN_rev	GTCGACTCTAGAGGATCCCCTTATGCGGACGGATCGGCGAGC
glnD-conf_fwd	CGGTGGACGAGCACACGCTGTTCG
glnE-UP_fwd	CGAATTTCGAGCTCGGTACCCCCGATCTTGGCCAGCGCC
glnE-UP_rev	CCCGGCCGAGCATGGTCGCGGCTATCCC
glnE-DOWN_fwd	CGCGACCATGCTCGGCCGGGTGGAGGACC
glnE-DOWN_rev	GTCGACTCTAGAGGATCCCCTGCCGCCCGCTCGGTTCG
glnE-conf_fwd	CGGCGACGATGCCCCGCGGTTGTACAG
pK18nifAUD_fwd	GCGCTTCTGAGGGACGGGCGACAGCAGG
pK18nifAUD_rev	CACCCGGCATGATCGACACCCCCTGCTCAAC
nifA_fwd	GGTGTCGATCATGCCGGGTGCAATGCGC
nifA_rev	CGCCCCGTCCCTCAGAAGCGCTTGATCTCGATGTTG
pK18-glnD_fwd	AGGGCCGGGGCGGCGACCATTCC
pK18-glnD_rev	TGGCGATGGCGGCCAGCAGCACGG
glyA-RTqPCR1_fwd	GGAGATCGCCAAGAAGATCA
glyA-RTqPCR1_rev	GCTCTTGGCGTAGGTCTTGA
nifA-RTqPCR1_fwd	TCATGATGCGGGAGACCTTC
nifA-RTqPCR1_rev	ATCAGCACGGTGGACTTGAA
nifH-RTqPCR1_fwd	ATCGTCATGTCCGGTGAGAT
nifH-RTqPCR1_rev	AGGTCGATTTCTTGTTCGGT
pJET1.2-fwd	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2-rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
M13-fwd	TGTAACACGACGGCCAGT
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGACC

---

#### 4.4.3 Análise estatística

Os ensaios realizados com as estirpes de *A. brasilense* e *E. coli* foram sempre feitos em, pelo menos, duplicata biológica e técnica, ou seja, cada ensaio apresentou ao menos duas culturas diferentes, cada uma com duas medições. As replicatas técnicas foram combinadas para gerar uma média para cada cultura, e então culturas da mesma estirpe tiveram seus dados combinados para gerar uma média e um desvio padrão; são estas as médias e desvios-padrão que são mostrados nos gráficos e nas tabelas dos resultados. O número de replicatas biológicas está sempre listado na descrição gráfica de cada resultado obtido. As comparações entre resultados de experimentos foram feitas usando o teste-t de Student, ou, no caso de amostras com variâncias muito divergentes, teste de Welch (ROSNER, 2015, p. 286-290; 298-304), sem correções, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ); para minimizar a chance de falsos positivos, apenas as comparações mais essenciais foram analisadas desta forma. Experimentos com menor número de amostras, como aqueles envolvendo PCR quantitativa para detecção de expressão gênica,

foram analisados pelo teste-t de Student com correção de Bonferroni (ROSNER, 2015, p. 570-574), buscando um nível de significância pré-ajuste de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.4 Modelagem estrutural e visualização de estruturas de proteínas

Os modelos estruturais de *AbNifA* foram construídos utilizando a ferramenta online ColabFold 1.4, que implementa os programas AlphaFold2 (JUMPER *et al.*, 2021) e AlphaFold-Multimer (EVANS *et al.*, 2021) em CPUs remotas ao usuário, sem necessidade de instalação de componentes ou do uso de computadores pessoais de alta performance (MIRDITA *et al.*, 2022). As modelagens foram feitas utilizando o programa AlphaFold-Multimer-v2, nas condições padrão: usando o algoritmo MMseqs2 para gerar o alinhamento das estruturas de proteína a servirem de molde (STEINEGGER e SÖDING, 2017), buscando contra o banco de dados UniRef+environmental, com três ciclos de re-avaliação do modelo pelo programa, gerando cinco modelos finais em formato .pdb. A introdução de mutações no modelo foi feita com edição manual da sequência de *AbNifA* para introduzir as substituições de interesse, seguida de modelagem *de novo* da sequência mutagenizada. As estruturas foram visualizadas com auxílio do programa PyMol (DeLANO, 2002), que foi utilizado para a geração das figuras apresentadas nos resultados.

### 4.5 Técnicas de manipulação de DNA

#### 4.5.1 Purificação de DNA genômico de *A. brasilense*

A extração de DNA genômico de *A. brasilense* foi realizada a partir de culturas saturadas. Para isso, colônias isoladas foram inoculadas em 3 mL de meio NFbHP-lactato contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM e os antibióticos apropriados, e os frascos incubados a 30°C por aproximadamente 20 horas sob agitação de 200 rpm. Ao final do crescimento, as culturas foram coletadas e 1,5 mL de cada cultura foi utilizado para a purificação de DNA genômico utilizando o kit comercial de extração GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade das amostras de DNA genômico extraídas foram determinadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose, respectivamente, conforme descrito mais adiante nas seções 4.5.4 e 4.5.3, respectivamente.

#### 4.5.2 Extração plasmidial

A extração de DNA plasmidial a partir de culturas de *E. coli* foi realizada utilizando o kit comercial de extração NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Alternativamente, na ausência do kit comercial foi empregado o

método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), com algumas modificações. Para isso, alíquotas de 1,5 mL de células de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas até a saturação em meio líquido e, posteriormente, coletadas e centrifugadas a 14.500 rpm por 1 minuto. O sedimento resultante da centrifugação foi ressuscitado em 150 µL de solução GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e Tris-HCl 25 mM pH 8,0) gelada. A lise das células foi realizada através da adição de 150 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M), e, para neutralização do pH, foram adicionados 150 µL de KacF (acetato de potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8). Após incubação em banho de gelo por 15 minutos, o DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares foram precipitados por centrifugação durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e tratado pela adição de 100 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos tubos, os quais foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 14.500 rpm. A fase aquosa foi então coletada, transferida para um novo tubo, e o DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 96%. Após homogeneização vigorosa e centrifugação por 15 minutos a 14.500 rpm, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, secado a vácuo ou à temperatura ambiente, e ressuscitado em 30 µL de água ultrapura. A concentração e a qualidade das amostras de DNA plasmidial extraídas foram determinadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose, respectivamente, conforme descrito nas seções 4.5.4 e 4.5.3, respectivamente.

#### **4.5.3 Eletroforese de DNA/RNA em gel de agarose**

Para análise dos fragmentos de DNA foi utilizado gel de agarose horizontal, como descrito por Sambrook *et al.* (1989), com modificações. As concentrações dos géis variaram de 0,8 a 2% (m/v), de acordo com os fragmentos que se queria separar, e os tampões utilizados foram TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) ou TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,3 e EDTA 1 mM), dependendo do objetivo da eletroforese. Durante o preparo dos géis, foi feita adição de solução de brometo de etídio para a concentração final de 0,6 µg/mL. As amostras a serem analisadas foram misturadas com tampão FSUDS (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol, 0,1% SDS e 20% Ficol) e as separações foram tipicamente realizadas a 70V por um período variável de acordo com a concentração do gel e os tamanhos dos fragmentos a serem separados. Uma mistura padrão de fragmentos de DNA (1 kb, Thermo Scientific) com diferentes tamanhos moleculares foi sempre aplicada em um poço de cada gel. Ao final de cada separação, os resultados foram analisados em um transiluminador de luz ultravioleta (315 nm) e os perfis eletroforéticos foram registrados utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

Para análise de RNA foi adotado o mesmo sistema descrito para DNA. Entretanto, o tampão TBE 1X foi preparado no momento do uso, e as cubas de eletroforese foram limpas previamente com uma solução removedora de RNase (RNaseZap™, Thermo Scientific), a fim de evitar eventuais degradações de amostras de RNA.

#### 4.5.4 Quantificação e avaliação da pureza de DNA/RNA

A quantificação de amostras de DNA e RNA foi rotineiramente feita por espectrofotometria através da leitura de absorbância no comprimento de onda de 260 nm utilizando o equipamento Nanodrop (NanoDrop® 2000, Thermo Scientific). Para avaliação da pureza das amostras extraídas foram consideradas as relações  $Abs_{260/280}$  (proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas) e  $Abs_{260/230}$  (proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de compostos orgânicos ou agentes caotrópicos). Valores acima de 1,8 para ambas as razões foram considerados aceitáveis.

#### 4.5.5 Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a maioria das reações de amplificação nas quais DNA genômico foi usado como *template*, foi empregada a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB), seguindo as recomendações do fabricante. Os sistemas finais de reação comumente continham tampão de reação de Q5 1X concentrado (com 2 mM  $Mg^{2+}$ ), 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada *primer*, 4-100 ng de DNA molde, 0,02 U/ $\mu$ L de Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, Q5 High GC Enhancer 1X concentrado e água ultrapura para completar o volume final desejado. Os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados e, em geral, baseavam-se em um ciclo inicial de desnaturação de 15 segundos a 98°C; 30 ciclos incluindo uma etapa de desnaturação de 15 segundos a 98°C, seguida de uma etapa de anelamento dos iniciadores de 15 segundos entre 65°C-72°C e uma etapa de extensão de 20 segundos/kb a 72°C; e um ciclo de extensão final de 2 minutos a 72°C.

Para a maioria das reações de amplificação utilizando DNA plasmidial ou colônias como *templates*, foi empregada a enzima Taq DNA polimerase obtida a partir do kit comercial GoTaq®Green Master Mix 2X (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os sistemas finais de reação eram tipicamente compostos por GoTaq®Green Master Mix 1X concentrado (tampão de reação com 1,5 mM  $Mg^{2+}$ , 200  $\mu$ M dNTPs, e Taq DNA polimerase), 0,5  $\mu$ M de cada *primer*, até 250 ng de DNA molde e água ultrapura para completar o volume final desejado. Os parâmetros de amplificação normalmente consistiam em um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos incluindo uma etapa de desnaturação de 15

segundos a 95°C, seguida de uma etapa de anelamento dos iniciadores de 20 segundos entre 60-70°C e uma etapa de extensão de 1 minuto/kb a 72°C; e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

A temperatura de anelamento dos *primers* utilizados neste trabalho foi definida utilizando a ferramenta NEBTm Calculator (NEB). Nos casos em que a amplificação se mostrou inespecífica, foram feitos gradientes de temperatura, a fim de definir a temperatura ótima de ligação de cada oligonucleotídeo.

#### **4.5.6 Clivagem de DNA com enzimas de restrição**

Endonucleases de restrição foram adquiridas das empresas Thermo Fisher Scientific, New England Biolabs ou Roche. As condições de reação, bem como quantidade de DNA, enzima e tampão, foram aquelas sugeridas pelo fabricante. Usualmente foram utilizados sistemas contendo 10 unidades de enzima para cada 1 µg de DNA a ser digerido, com período de incubação de pelo menos 2 horas para assegurar digestão total. Para confirmação da correta clonagem de fragmentos em vetores, foram utilizados sistemas de reação pequenos de até 10 µL, sendo os produtos analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito na seção 4.5.3. Para a purificação de fragmentos oriundos da ação de enzimas de restrição, foram empregados sistemas de ao menos 50 µL. A inativação térmica de enzimas de restrição foi feita por meio do aquecimento dos sistemas a 80°C por um período não inferior a 20 minutos. Alternativamente, foram empregados kits comerciais de purificação de fragmentos de DNA, conforme descrito abaixo na seção 4.5.7.

#### **4.5.7 Purificação de fragmentos de DNA**

A purificação de fragmentos de DNA provenientes de reações de PCR ou da ação de enzimas de restrição foi realizada utilizando o kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), de acordo com as recomendações do fabricante. Quando as reações de amplificação resultaram em bandas únicas e específicas observadas após eletroforese em gel de agarose, os produtos foram purificados diretamente utilizando colunas *Clean-up* para eliminação dos componentes dos tampões de reação. Alternativamente, no caso de produtos de PCR que resultaram em mais de uma banda visível após eletroforese em gel de agarose ou em situações nas quais era necessária a purificação de diferentes fragmentos liberados por reação de digestão, foi realizada inicialmente a separação eletroforética de DNA em gel de agarose 1% sob baixa voltagem (40-70 V). Em seguida, as bandas de interesse foram recortadas do gel devidamente corado com solução de brometo de etídio e por meio do uso de transiluminador

(UVP). Uma vez removidas do gel, as bandas foram purificadas utilizando o mesmo kit comercial de extração supramencionado.

#### **4.5.8 Ligação de fragmentos de DNA aos vetores**

##### **4.5.8.1 Reação de Gibson Assembly**

Os fragmentos resultantes de reações de amplificação foram comumente adicionados aos vetores de interesse usando montagem enzimática isotérmica, conhecida como método de Gibson Assembly (GIBSON *et al.*, 2009). Essa técnica consiste em uma reação única para a ligação de múltiplas moléculas de DNA por regiões de complementariedade, através da ação combinada de uma exonuclease 3', uma DNA polimerase e uma DNA ligase. O planejamento dos *primers* foi feito utilizando a ferramenta NEBuilder Assembly (NEB), conforme descrito na seção 4.4.2. Para as reações de montagem foi utilizado o reagente 2X NEBuilder Hifi DNA Assembly Master Mix (NEB), de acordo com as recomendações do fabricante. Os cálculos para obtenção da proporção molar 3:1 inserto:vetor foram obtidos a partir da ferramenta NEBioCalculator, disponibilizada pela mesma empresa. As reações foram incubadas a 50°C por um período de 60 minutos em um termociclador, e 5 µL de cada montagem foram usados para transformação em *E. coli* TOP10 quimiocompetentes.

##### **4.5.8.2 Ligação rápida de DNA**

Para ligação de fragmentos de DNA a vetores por meio do uso de pontas coesivas produzidas pela ação de enzimas de restrição ou para clonagens do tipo *blunt*, foi utilizado o kit comercial Quick Ligation™ M2200 (NEB), de acordo com as recomendações do fabricante. Os sistemas de ligação tipicamente continham uma mistura de DNA plasmidial linearizado e DNA a ser inserido em uma proporção molar de 1:3, respectivamente, calculada utilizando a ferramenta NEBioCalculator (NEB). Após serem preparadas, as reações foram incubadas à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e então 1-5 µL foram usados para transformar 100 µL de células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes.

#### **4.5.9 Mutagênese sítio-dirigida**

Para a inserção de mutações pontuais em códons específicos do DNA foi utilizada a estratégia de mutagênese dirigida por oligonucleotídeos (HO *et al.*, 1989), na qual são utilizados *primers* complementares a uma região do gene contendo um (ou mais) erros de pareamento, os quais introduzem as mutações desejadas no gene. Inicialmente, as regiões alvo de mutagênese foram amplificadas em dois fragmentos individuais utilizando dois pares de *primers*: um *primer*

5' no início da CDS do gene com um *primer* 3' mutagênico; e um primer 5' mutagênico (reverso complemento do *primer* 3' mutagênico) com um *primer* 3' no final da CDS do gene. As amplificações foram feitas pela técnica de reação em cadeia da polimerase utilizando Q5 DNA polimerase e o DNA genômico da estirpe FP2 como *template*, conforme descrito no item 4.5.5. Os fragmentos resultantes das amplificações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e extraídos do gel, conforme já descrito (item 4.5.7). Após quantificação do DNA obtido (item 4.5.4), 15 fmol de cada fragmento foram utilizados como DNA molde para reações de PCR *overlapping* (contendo os *primers* 5' e 3' externos não mutagênicos), a fim de ligá-los pela região complementar entre os mesmos. Os produtos dessas reações continham o gene de interesse completo com as mutações nos códons desejados e foram usados para clonagem nos vetores de interesse, conforme descrito no item 4.5.8.2.

#### 4.5.10 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi feito através pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977) utilizando dideoxynucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos (PROBER *et al.*, 1987). Os fragmentos de DNA originados de plasmídeos ou produtos de PCR foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit comercial Mix2Seq (Eurofins Genomics), de acordo com as sugestões do fabricante. Para isso, as amostras foram inicialmente purificadas utilizando coluna comercial do kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), conforme descrito no item 4.5.7 e, em seguida, preparadas para a reação de sequenciamento, de acordo com a Tabela 10 abaixo. O volume total compreendia 17 µL, sendo 15 µL de amostra de DNA e 2 µL de *primer* de sequenciamento. As amostras foram então enviadas para a empresa Eurofins Genomics, que realizou a eletroforese dos fragmentos gerados e enviou o cromatograma como resultado.

**Tabela 10 - Preparo de amostras de sequenciamento**

Tipo de amostra	Concentração de DNA	Concentração de <i>primer</i>
Plasmídeo (até 15 Kb)	50-100 ng/µL	10 µM
Produto de PCR (150-300 pb)	1 ng/µL	10 µM
Produto de PCR (300-1000 pb)	5 ng/µL	10 µM
Produto de PCR (>1000 pb)	10 ng/µL	10 µM

Alternativamente, na ausência de kit comercial as amostras processadas manualmente para uso em sequenciador. Para a maioria das reações, foram utilizados 2 µL de tampão Save

Money 10X, 1  $\mu$ L de uma mistura de dideoxinucleotídeos e DNA polimerase (BigDye® Terminator v3.1 – Applied Biosystems), 0,5  $\mu$ L de *primer forward* ou *reverse* a 10  $\mu$ M e água ultrapura para completar volume de 10  $\mu$ L de reação. A massa de plasmídeo utilizada nas reações de sequenciamento variou entre 200-500 ng de DNA. Alternativamente, produtos de PCR foram utilizados como DNA molde e, nestes casos, a massa adicionada variou de acordo com o tamanho do produto. Os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados, e normalmente consistiam em um ciclo inicial de 1 minuto a 95°C; seguido de 30 ciclos incluindo uma etapa de 15 segundos a 95°C e outra de 4 minutos a 60°C; e extensão final de 5 minutos a 60°C. Os produtos das reações de sequenciamento, acrescidos de 10  $\mu$ L de água ultrapura, foram precipitados para remoção de restos de *primers*, dNTPs e sais. Para isso, foram adicionados 2  $\mu$ L de solução de acetato de amônio 7,5 M e 66  $\mu$ L de etanol 96%. Em seguida, foi feita uma incubação das amostras a -80°C durante 30 minutos e os produtos precipitados foram recuperados por centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Por fim, os *pellets* foram lavados com etanol 70%, secados, e analisados em um sequenciador ABI3500 Genetic Analyzer operado por pessoal especializado no Departamento de Bioquímica da UFPR.

#### **4.6 Análise de expressão gênica por RT-qPCR**

##### **4.6.1 Condições de crescimento de estirpes para extração de RNA**

Para análise dos níveis de transcritos dos genes *nifA* e *nifH* em estirpes de *A. brasilense*, as estirpes foram inicialmente cultivadas em 3 mL de meio NFbHPN-lactato líquido na presença dos antibióticos adequados a 30°C e 200 rpm, até a saturação. Após o período de crescimento, as culturas foram re-inoculadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio NFbHP-lactato contendo 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl e os antibióticos adequados. Adicionalmente, para alguns experimentos foi feita a suplementação com 2 mM de glutamina, a fim ajustar as taxas de crescimento de estirpes mutantes excretoras. Após cerca de 18 horas de incubação a 30°C e 200 rpm, as culturas foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em 10 mL de meio NFbHP-lactato livre de amônio. As suspensões bacterianas foram então usadas para inocular frascos contendo 20 mL de meio NFbHP-lactato na ausência de nitrogênio (condição de baixo amônio) ou com 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio). A D.O.<sub>600nm</sub> inicial utilizada foi de 0,3 e a concentração de oxigênio da fase gasosa foi ajustada para 4%, após troca gasosa por nitrogênio. Os frascos foram então incubados a 120 rpm por um período de 4 horas antes da extração do RNA total das culturas, utilizando o protocolo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), como descrito na seção 4.6.2 abaixo.

#### 4.6.2 Purificação de RNA

Para a purificação de RNA, vinte mililitros de cada cultura foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e misturados a 4 mL de solução de parada (5% de fenol saturado com citrato 0,1 M pH 4,3 e 95% de etanol). Após homogeneização por inversão, os tubos foram incubados em gelo por 20 minutos e então centrifugados a 7.000 rpm e 4°C por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas e lisadas pela adição de 1 mL de reagente TRI (Sigma Aldrich - T9424). Após a incubação das amostras à temperatura ambiente por 5 minutos, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos tubos, os quais foram agitados por cerca de 15 segundos manualmente e novamente incubados à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 12.000 g e 4°C por 15 minutos, sendo as fases aquosas transferidas para um novo tubo e misturadas com 500 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugadas a 12.000 g e 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram descartados cuidadosamente e o *pellets* lavados pela adição de 1 mL de etanol 70%. Numa próxima etapa, os tubos foram centrifugados a 7.500 g a 4°C por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Por fim, as amostras de RNA foram secas em fluxo laminar por cerca de 10 minutos e ressuspensas em 100 µL de água ultrapura livre de RNase. A confirmação da integridade e concentração das amostras extraídas foi feita por meio de análise de eletroforese em gel de agarose 1% e medição espectrofotométrica em Nanodrop, respectivamente, como descrito nas seções 4.5.3 e 4.5.4.

Após a confirmação da extração e quantificação das amostras de RNA, foi feita uma etapa de tratamento com DNase. Para isso, foi utilizado o kit comercial Turbo DNA-free™ (Ambion), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram preparadas em um volume final de 50 µL e continham 6 µg de cada amostra de RNA diluídos em 44 µL de água ultrapura, 5 µL do tampão de DNase turbo para uma concentração final de 1X e 1 µL da DNase turbo. As reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, em seguida, acrescidas de mais 0,5 µL de DNase turbo, sendo feita uma nova incubação a 37°C por 15 minutos. Após este segundo período de incubação, 10 µL do reagente de inativação de DNase foram adicionados aos tubos, os quais foram incubados à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo manualmente agitados a cada minuto. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 14.500 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente, e cerca de 45 µL de cada fração sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para um novo tubo. A confirmação da eliminação de DNA genômico residual das amostras de RNA foi feita tanto por eletroforese em gel de agarose 1%, quanto por reação de PCR utilizando os *primers* glyA-RTqPCR1\_fwd e glyA-RTqPCR1\_rev, de amplificação

conhecida. A quantificação das amostras de RNA foi novamente determinada por quantificação espectrofotométrica em um aparelho Nanodrop.

#### 4.6.3 Reação de PCR quantitativa (qPCR)

As amostras de RNA devidamente tratadas com DNase foram utilizadas para síntese de cDNA usando o kit comercial SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. As reações continham 1 µg de cada amostra de RNA diluído em 11 µL de água ultrapura, e 2 µL de uma mistura de *primers* aleatórios (Invitrogen) e dNTPs (sendo 1 µL de *primers* aleatórios diluídos dez vezes e 1 µL de dNTPs 10 mM). Os tubos foram colocados em um termociclador a 65°C por 5 minutos, e então resfriados a 4°C. Em seguida, foram adicionados 6 µL de uma mistura de First-Strand Buffer e DTT (sendo 4 µL de tampão 5X concentrado e 2 µL de DTT 0,1 M), e os tubos foram incubados a 25°C por 2 minutos. Ao final desse período de incubação, o programa no termociclador foi pausado para a adição 1 µL de enzima SuperScript II em cada tubo. Na sequência, a reação foi continuada por mais 13 minutos a 25°C, seguidos de 50 minutos a 42°C e então 15 minutos a 70°C.

Para as reações de qPCR, foi utilizado o kit comercial SensiFAST™ SYBR® No-ROX (Bioline), de acordo com as recomendações do fabricante. Os sistemas de reações continham 10 µL do reagente SensiFAST™ SYBR® No-ROX, 0,5 µL de uma mistura dos *primers forward* e *reverse* para os genes alvos (10 pmol cada) e 2 µL de cada amostra de cDNA diluída 10X. As reações foram feitas em triplicata utilizando o equipamento Bio-Rad CFX96 e parâmetros previamente estabelecidos. As reações também foram realizadas com três diluições de DNA genômico ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) como *template* para gerar a curva padrão de qPCR. Para a análise de dados, foi utilizando o método  $\Delta Cq$  implementado em planilha no Microsoft Excel para quantificação relativa de transcritos utilizando *glyA* como gene de referência, amplificado com os *primers glyA-RTqPCR1\_fwd* e *glyA-RTqPCR1\_rev*.

### 4.7 Transformação bacteriana

#### 4.7.1 Preparo de células quimiocompetentes utilizando MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>

Células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 e S17.1 foram preparadas seguindo o método baseado no uso de soluções de cloreto de magnésio e cloreto de cálcio (CHAN *et al.*, 2013). Inicialmente, uma cultura líquida de *E. coli* crescida até a saturação foi utilizada como inóculo para 100 mL de meio LB em um frasco do tipo erlenmeyer de 1 L para uma proporção de 1:100. O cultivo foi realizado a 30°C e 120 rpm até que a cultura atingisse uma D.O.<sub>595nm</sub> entre 0,3 e 0,4. Após o período de incubação, a cultura foi dividida em 2 tubos do tipo Falcon

de 50 mL, os quais foram centrifugados a 4.000 rpm e 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sedimento resultante foi ressuspensionado lentamente em 15 mL de solução MgCl<sub>2</sub> 0,1 M. Após a etapa de ressuspensão, foi realizada uma nova centrifugação a 4.000 rpm e 4°C por 10 minutos, sendo o sedimento ressuspensionado em 25 mL de solução CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e incubado em banho de gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se a suspensão novamente a 4.000 rpm e 4°C por 10 minutos, e, em seguida, ressuspendeu-se cuidadosamente as células em 4 mL de uma solução CaCl<sub>2</sub> 0,1 M com 20% de glicerol. Aliquotas de 100 µL foram preparadas e estocadas em freezer a -80°C até o momento do uso.

#### **4.7.2 Transformação bacteriana por choque térmico**

Para a transformação bacteriana, plasmídeos ou reações de ligação foram adicionados a uma suspensão de 100 µL de células quimiocompetentes pelo método descrito no item 4.7.1. Após homogeneização cuidadosa do DNA nas células, o sistema foi incubado por 30 minutos em banho de gelo. Ao final do tempo de incubação, as células foram submetidas a choque térmico (45 segundos a 42°C, seguidos de 3 minutos no gelo) e recuperadas através de adição de 900 µL de meio SOC. Após a recuperação a 37°C por uma hora em incubadora estática, aproximadamente 100 µL da suspensão foram plaqueados em meio LA contendo os antibióticos apropriados e indicadores para seleção de clones, conforme necessidade.

#### **4.8 Conjugação bacteriana biparental**

Os plasmídeos recombinantes a serem transferidos para as estirpes de *A. brasilense* foram primeiramente transformados em *E. coli* S17.1, conforme método descrito em 4.7.2. Colônias isoladas de estirpes de *A. brasilense* (receptoras) foram inoculadas em frascos contendo 20 mL de meio NFbHPN-malato líquido e os antibióticos apropriados. Em seguida, os frascos foram incubados a 30°C e 200 rpm por cerca de 24 horas, até que as culturas atingissem a saturação. Concomitantemente, estirpes de *E. coli* (doadoras) transformadas com os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo os antibióticos de seleção. Os frascos foram então incubados a 37°C e 250 rpm *overnight* até a saturação. No dia da conjugação, 100 µL das culturas de *E. coli* foram utilizados para re-inocular 5 mL de meio LB com os antibióticos apropriados, e os frascos foram incubados a 37°C e 250 rpm por 3 horas. Após o período de incubação, 4 mL das culturas de *A. brasilense* e 1 mL das culturas de *E. coli* foram coletados e centrifugados separadamente a 5.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, os sedimentos foram ressuspensionados em 1 mL de solução de KCl 0,8 %, e centrifugados novamente a 5.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente. Após três repetições dos processos de lavagem e centrifugação, os *pellets* finais

foram ressuspensos em 100  $\mu$ L de solução de KCl 0,8%. Em seguida, 50  $\mu$ L das ressuspensões de *A. brasilense* foram misturados a 50  $\mu$ L das ressuspensões de *E. coli*, e as misturas foram depositadas como gotas de 10  $\mu$ L cada em placas contendo meio NFbHPN-malato sólido e LA na proporção de 3:1, sem antibióticos. Após a incubação das placas a 30°C por cerca de 20 horas, as massas de células foram raspadas, ressuspensas em microtubos contendo 1 mL de solução de KCl 0,8%, e centrifugadas a 5.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 600  $\mu$ L de solução de KCl 0,8%. Por fim, alíquotas de 100  $\mu$ L foram espalhadas em placas contendo meio NFbHPN-malato sólido e os antibióticos apropriados para seleção de colônias transconjugantes, que comumente se tornavam visíveis após o terceiro dia de incubação a 30°C.

## **4.9 Estratégia para obtenção de mutantes cromossômicos de *A. brasilense***

### **4.9.1 Construção de mutantes contendo deleção total ou parcial de genes**

A estratégia de mutagenese utilizada para deleção completa dos genes *nifA* e *draT*, bem como da porção N-terminal dos genes *nifA* e *glnE* de *A. brasilense*, residiu na amplificação das regiões localizadas à montante (UP) e à jusante (DOWN) das regiões alvo de deleção a partir do DNA genômico da estirpe FP2 através da técnica de PCR, conforme descrito na seção 4.5.5, seguida da ligação dos fragmentos UP e DOWN entre si e a vetores apropriados para transmissão a *Azospirillum*. As sequências utilizadas para o planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores foram coletadas a partir de uma montagem genômica da estirpe FP2 de *A. brasilense* realizada pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN) da UFPR. Sequências que ainda não estavam devidamente anotadas foram identificadas por meio da busca dos genes de interesse no banco de dados GenBank (NCBI). Com as sequências obtidas e através do uso da ferramenta BLAST, foi possível identificar as CDS dos genes não anotados na montagem do genoma de FP2.

Os fragmentos resultantes das amplificações das regiões à montante e à jusante (1 a 2 kb cada) das regiões codificadoras dos genes, foram inseridos no vetor mobilizável pK18mobsacB (SCHAFER *et al.*, 1994) por meio da técnica de Gibson Assembly, conforme descrito na seção 4.5.8.1. A inserção dessas regiões teve como objetivo aumentar o grau de homologia entre o vetor construído e o genoma de *A. brasilense*, favorecendo, portanto, a recombinação homóloga necessária para a obtenção dos mutantes. O marcador de seleção negativa, *sacB* (isolado de *Bacillus subtilis* por Philippe Gay e colaboradores em 1983), parte do vetor mutagênico, possibilita o uso de uma pressão de seleção negativa para o isolamento

de bactérias que tenham sofrido a deleção da região de interesse. O cassete contendo o gene *sacB* também inclui um gene de resistência à canamicina (*sacBKm*), o que permite a seleção de bactérias que tenham sofrido integração do plasmídeo em seu genoma.

Após a construção dos plasmídeos mutagênicos, estes foram transferidos para as estirpes de *A. brasilense* de interesse pela técnica de conjugação biparental, descrita na seção 4.8. A seleção de bactérias transconjugantes, isto é, que sofreram o primeiro evento de recombinação, foi feita utilizando as seguintes concentrações dos seguintes antibióticos: canamicina 100 µg/mL (resistência conferida pelo cassete *sacBKm*) e ácido nalidíxico 10 µg/mL (marca de resistência da bactéria). Neste momento, o plasmídeo integra-se ao genoma da bactéria através de recombinação homóloga entre o gene selvagem e o fragmento UP ou DOWN contido no plasmídeo.

A confirmação dos mutantes simples foi feita através de reação de PCR usando os *primers* 5' e 3' de cada conjunto de fragmentos UP e DOWN, visando detectar a presença de duas cópias do gene alvo (uma cópia selvagem e uma cópia deletada, advinda da inserção do vetor). Em seguida, colônias isoladas das estirpes de *A. brasilense* contendo os plasmídeos mutagênicos integrados foram cultivadas em 3 mL de meio NFbHPN-malato líquido na ausência do antibiótico canamicina por cerca de 24 horas a 30°C e 200 rpm. As culturas foram transferidas por 3 vezes para meio NFbHPN-malato líquido novo, sendo a cada vez incubadas nas condições já descritas por 24 horas. Ao fim do último cultivo, 100 µL das culturas foram plaqueados em meio NFbHPN-malato sólido contendo 10% de sacarose e na ausência de canamicina (culturas concentradas e diluídas a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Nesta etapa é possível a seleção de colônias que sofreram o segundo evento de recombinação, o qual é caracterizado pela saída do plasmídeo do genoma carregando parte do gene a ser deletado. A expressão do gene *sacB* é letal em *A. brasilense* na presença de sacarose, já que resulta em um acúmulo de polímeros de frutose no espaço periplasmático, levando a lise das células (STEINMETZ *et al.*, 1983). A confirmação dos duplos mutantes foi feita em duas etapas. Na primeira, colônias crescidas na presença de sacarose foram testadas quanto à capacidade de crescer na presença de canamicina. Colônias sensíveis a esse antibiótico foram submetidas à análise de PCR para confirmação da presença apenas da cópia deletada do gene. Na segunda etapa, as sequências gênicas dos fragmentos amplificados na primeira etapa foram obtidas por meio de reação de sequenciamento e analisadas por alinhamento no programa MEGAX.

## 4.9.2 Construção de mutantes contendo mutação pontual de genes

### 4.9.2.1 Construção de mutantes pontuais de NifA

A estratégia de mutagênese empregada para a inserção das mutações pontuais de NifA no genoma de *A. brasilense* baseou-se no uso da amplificação mutagênica dirigida por oligonucleotídeos, descrita na seção 4.5.9. Os produtos dessas reações foram clonados no vetor pK18mobsacB, utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). Em seguida, os plasmídeos construídos foram transferidos para a estirpe FP2 contendo deleção completa do gene *nifA* (FP2 $\Delta$ *nifA*) por conjugação biparental (seção 4.8). As etapas subsequentes para obtenção dos mutantes simples e duplos foram as mesmas descritas no item 4.9.1.

### 4.9.2.2 Construção de mutante pontual de GlnD

Para a inserção das mutações H552A e D553A em GlnD foi inicialmente feita a amplificação mutagênica do gene *glnD* a partir do DNA genômico da estirpe FP2 de *A. brasilense* em dois fragmentos distintos (fragmentos UP e DOWN) por meio de reação de PCR utilizando os pares de *primers* *glnD*-UP\_fwd/*glnD*-UP\_rev e *glnD*-DOWN\_fwd/*glnD*-DOWN\_rev (seção 4.5.5). O planejamento dos *primers* mutagênicos foi feito utilizando a ferramenta NEBuilder Assembly (NEB), que permite a produção de regiões de complementariedade entre os fragmentos amplificados e o vetor de clonagem (seção 4.4.2). Em seguida, os fragmentos foram adicionados ao vetor pK18mobsacB em uma reação única, utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1), sendo o vetor mutagênico resultante (pTMA2601) sequenciado com o *primer* *glnD*-conf\_fwd para confirmar a correta inserção das mutações desejadas.

Uma vez que as mutações pontuais inseridas não alterariam o tamanho do gene *glnD*, a confirmação de mutantes ficaria restrita à reação de sequenciamento. Com o intuito de facilitar as etapas de confirmação de mutantes simples e duplos, foi feita a alteração da base C1674 (C→G) participante de um sítio de restrição *SacII* localizado próximo aos códons dos resíduos H552 e H553. A substituição C1674G de *glnD* permitiu a destruição do sítio *SacII*, sem alterar o resíduo de aminoácido (R558→R558). Para a inserção dessa mutação pontual foi utilizado o kit comercial Q5 Site-Directed Mutagenesis (NEB) em três etapas, seguindo as recomendações do fabricante. O planejamento dos *primers* mutagênicos foi feito utilizando a ferramenta NEBaseChanger<sup>TM</sup> (NEB).

Na primeira etapa, os *primers* pK18-*glnD*\_fwd e pK18-*glnD*\_rev com as extremidades 5' alinhadas do tipo *back-to-back*, foram usados em um sistema reação de 25  $\mu$ L contendo Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix 1X concentrado, 0,5  $\mu$ M de cada *primer* e 4 ng de *template*

(pTMA2601). Os parâmetros de amplificação consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 98°C por 30 segundos; seguido de 30 ciclos com uma etapa de desnaturação a 98°C por 15 segundos e uma etapa de anelamento e extensão a 72°C por 4 minutos e 30 segundos (*2-steps* PCR); e um ciclo final de extensão a 72°C por 2 minutos. Na segunda etapa, o produto dessa reação foi utilizado na reação de KLD (componente do kit Q5 Site-Directed Mutagenesis - NEB), que emprega a ação combinada de enzimas quinase, ligase e *DpnI*, permitindo reações de fosforilação, ligação e remoção do *template* em uma única etapa, respectivamente. O sistema de reação de volume final de 10 µL possuía 1 µL do produto de PCR da etapa 1, tampão de reação KLD 1X concentrado, mix de enzimas KLD 1X concentrado e 3 µL de água ultrapura. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Na terceira etapa, 5 µL foram utilizados para transformar células de *E. coli* TOP 10, como descrito na seção 4.7.2. Após a confirmação do plasmídeo mutagênico resultante, pTMA2602, por reações de restrição e sequenciamento, este foi transferido para a estirpe FP2 de *A. brasilense* pela técnica de conjugação biparental (seção 4.8). As etapas subsequentes para obtenção dos mutantes simples e duplos foram as mesmas descritas no item 4.9.1. A confirmação de mutantes simples e duplos ocorreu tanto por reação de restrição, quanto sequenciamento (utilizando o *primer* *glnD-conf\_fwd*).

#### 4.9.2.3 Construção de mutante pontual de *GlnA*

Para a construção de uma estirpe contendo a mutação P347L em GS, inicialmente foi feita a amplificação do gene *glnA* a partir do DNA genômico da estirpe HM053 por reação de PCR utilizando o par de *primers* *glnA\_fwd* e *glnA\_rev*. O planejamento dos *primers* foi feito utilizando a ferramenta NEBuilder Assembly (NEB), e o produto obtido foi inserido no plasmídeo pK18mobsacB utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). Após a confirmação da correta construção do vetor mutagênico por reações de restrição e sequenciamento, este foi transferido para a estirpe selvagem FP2 de *A. brasilense* pela técnica de conjugação biparental (seção 4.8). Uma vez que as cópias selvagem e mutante do gene apresentam o mesmo tamanho (por se tratar de uma mutação pontual), a confirmação do mutante simples foi feita através de análise de restrição. Convenientemente, a posição 1040 do gene *glnA* de FP2 é envolvida na formação de um sítio de restrição para a enzima *BsiWI*, o qual é destruído pela mutação de citosina para timina. Após a confirmação de mutantes simples pelo padrão de restrição esperado, estes foram cultivados na ausência de canamicina para obtenção de mutantes duplos, assim como descrito no item 4.9.1. A confirmação da correta construção do mutante de GS foi feita tanto por reação de restrição (utilizando a enzima *BsiWI*) quanto por sequenciamento (utilizando os *primers* *glnA\_fwd* e *glnA\_rev*).

## 4.10 Manipulação de proteínas

### 4.10.1 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais de culturas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), adaptado para placas de ELISA de 96 poços. Antes do início de cada ensaio de determinação da concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão utilizando uma solução estoque de BSA (albumina sérica bovina) a 0,2 mg/mL. Para isso foram usadas quantidades da proteína padrão que variaram de 0 µg a 6 µg por poço em um volume de 30 µL de amostra e as medições foram feitas em triplicata de reação. Ao volume de 30 µL de cada amostra no poço de leitura, foram adicionados 170 µL de reativo de Bradford e, em seguida, efetuada a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro CLARIOstar (BMG Labtech). A curva padrão foi gerada plotando os valores de concentração de proteína na abscissa contra os valores encontrados para média das absorbâncias na ordenada. A equação da curva foi determinada por regressão linear e R-quadrados superiores a 0,98 foram considerados confiáveis para a dosagem de proteínas totais.

Após a determinação da curva padrão de BSA foi feita a dosagem de proteínas totais de culturas de bactérias. Para isso, 50 µL dos homogeneizados obtidos após agitação vigorosa das culturas semi-sólidas foram transferidos para uma placa de ELISA de 96 poços e misturados a 50 µL de solução NaOH 0,2 M. Em seguida, a placa foi revestida de papel do tipo Parafilm, incubada a 30°C *overnight* para lise e, assim como para a curva padrão, foram feitas triplicatas de amostras. Após o tempo de incubação, 30 µL dos produtos de lise foram transferidos para uma nova placa de ELISA de 96 poços e adicionados de 170 µL de reativo de Bradford. A leitura dos produtos foi efetuada a 595 nm em um espectrofotômetro, e através da média das absorbâncias encontradas, foi possível determinar a concentração de proteínas totais das culturas, utilizando a equação da reta gerada pela curva padrão de BSA.

### 4.10.2 Eletroforese de proteínas

#### 4.10.2.1 Eletroforese em condições desnaturantes

A análise de amostras proteicas em condições desnaturantes foi feita em gel de poliacrilamida 7,5% ou 12% (Tabela 11) (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). Rotineiramente, as amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra 3X (6% SDS; 30% glicerol; 0,03% azul de bromofenol; 180 mM Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol) em uma proporção de 3:1, e fervidas a 100°C por cerca de 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical de acordo com as

recomendações do fabricante (Biorad) a 100-170V em tampão de corrida 1X (3 g/L Tris-base; 14,4 g/L glicina; 1 g/L SDS) por 1-2 horas. Em seguida, os géis foram corados por períodos variáveis com Coomassie Blue (0,55 g/L Coomassie Blue R-250; 45% metanol; 10% ácido acético glacial) e descorados com solução descorante (45,5% metanol; 9,1% ácido acético glacial). Alternativamente, o conteúdo dos géis foi transferido para membranas PVDF para análise de *western-blotting*.

**Tabela 11 - Composição de géis SDS-PAGE**

<b>Gel separador</b>	<b>7,5%</b>	<b>12%</b>	<b>Gel de empilhamento</b>	<b>4,5%</b>
H <sub>2</sub> O	5,48 mL	4,35 mL	H <sub>2</sub> O	3,16 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,5	1,3 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	SDS 10%	50 µL
Acrilamida 40%	1,88 mL	3 mL	Acrilamida 40%	487,5 µL
APS 10%	100 µL	100 µL	APS 10%	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	TEMED	4 µL

#### 4.10.2.2 Eletroforese em condições nativas

A análise de proteínas em condições não-desnaturantes foi feita conforme descrito no item 4.10.2.1, com as seguintes modificações:

- 1) As amostras foram tipicamente diluídas em tampão de amostra 3X (30% glicerol; 0,03% azul de bromofenol; 180 mM Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) em uma proporção 3:1 e aplicadas no gel sem serem fervidas;
- 2) O tampão de corrida continha 0,6 g/L Tris-base e 2,8 g/L glicina;
- 3) As corridas eram feitas a 100 V por 4 horas.

O gel nativo possuía uma composição distinta, semelhante ao utilizado por Bonatto e colaboradores (2007), conforme descrito na Tabela 12 abaixo:

**Tabela 12 - Composição de gel *Native-PAGE***

<b>Gel separador</b>	<b>12%</b>	<b>Gel de empilhamento</b>	<b>10 %</b>
H <sub>2</sub> O	3 mL	H <sub>2</sub> O	2 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,5	0,5 mL
Nonidet P-40 0,25%	1 mL	Nonidet P-40 0,25%	0,5 mL
Acrilamida 40%	3 mL	Acrilamida 40%	1 mL
APS 10%	100 µL	APS 10%	40 µL
TEMED	10 µL	TEMED	10 µL

### 4.10.3 *Western-blotting*

#### 4.10.3.1 Preparo de extratos proteicos

As estirpes de interesse foram cultivadas em meio líquido em condições de limitação ou suficiência de nitrogênio sob D.O.<sub>600nm</sub> e concentração de oxigênio da fase gasosa iniciais pré-estabelecidos, conforme descrito mais adiante na seção 4.11.3.1. Após período de 4 horas de incubação, as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 300 µL de solução Tris-HCl 50 mM pH 8,0, e os homogeneizados transferidos para microtubos de 1,5 mL antes de serem sonicados por aproximadamente 90 segundos (15 *on*/15 *off*) em banho de gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 10 minutos a 4°C e as frações solúveis transferidas para novos tubos e congeladas.

#### 4.10.3.2 Eletroforese e transferência

A concentração de proteínas totais das frações solúveis descritas no item 4.10.3.1 foi determinada pelo método de Bradford (item 4.10.1), e 10 µg de cada amostra foram aplicados nos géis para as eletroforeses em condições nativas (para análise de PII) ou desnaturantes (para análise de GS) (item 4.10.2). Ao fim das corridas, o conteúdo proteico dos géis foi transferido para membranas de PVDF 0,45 µM (Amersham<sup>TM</sup> Hybond<sup>TM</sup>, GE Healthcare). Para isso, foi utilizado o equipamento de transferência eletroforética 2117-250 Novablot (LKB Bromma) em um sistema semi-seco. Os tampões utilizados foram denominados A1 (0,3 M Tris pH 10; 20% metanol), A2 (0,025 M Tris pH 10; 20% metanol) e C (0,025 M Tris pH 10; 20% metanol; 0,04 M ácido capróico). A placa do ânodo foi inicialmente molhada com tampão A1, onde foram depositadas 4 folhas de papel filtro embebidas também em tampão A1. Na sequência, foram adicionadas ao sistema 2 camadas de papel filtro imersas em tampão A2, a membrana PVDF pré-ativada em metanol e lavada em tampão A2, o gel proveniente da eletroforese previamente equilibrado em tampão C, e mais 6 folhas de papel filtro imersas em tampão C, seguindo esta ordem exata. O sistema, comumente denominado “sanduíche”, foi gentilmente comprimido com o auxílio de um bastão de vidro com o intuito de remover eventuais bolhas de ar, antes de ser isolado pela adição da placa do cátodo. O equipamento foi então conectado a uma fonte de eletroforese a 80 mA por 1 hora. A voltagem foi monitorada e variou entre 4-8 V. Como controle da transferência, tipicamente foi utilizado um marcador de proteínas pré-corado (New England Biolabs). Alternativamente, os géis e membrana foram corados com solução azul de Coomassie (item 4.10.2.1) ou Ponceau S (0,1% m/v em 5% de ácido acético), respectivamente.

#### 4.10.3.3 Tratamento da membrana e revelação

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST (2,4 g/L Tris-HCl pH 7,6; 8,8 g/L NaCl; 1 mL/L Tween 20) por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em TBST por cerca de 5 minutos e incubada em solução de leite em pó desnatado 5% em TBST contendo o anticorpo primário na diluição desejada (1:5.000 para anti-GS, 1:15.000 para anti-GlnB e 1:10.000 para anti-GlnZ) por cerca de 3 horas. Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes com solução TBST por 5 minutos e incubada com solução de leite em pó desnatado 3% em TBST contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase – GE Healthcare) na proporção de 1:10.000 por 1 hora. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com solução TBST por 5 minutos e então submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante, e os sinais luminosos capturados em filmes de raio-X (Biomax – GE Healthcare).

#### 4.10.4 Análise de proteínas por MALDI-TOF

##### 4.10.4.1 Extração de bandas de proteínas do gel

A identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS foi realizada de acordo com Shevchenko e colaboradores (1996), com algumas modificações. As amostras dos extratos proteicos descritos em 4.10.3.1 foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 7,5% e a separação eletroforética foi acompanhada através de um marcador de proteínas pré-corado (New England Biolabs) a 170V por cerca de 1 hora e meia. O gel de poliacrilamida foi mentalmente dividido em duas partes idênticas, com as mesmas amostras aplicadas em ambas (corrida em duplicata), o que permitiu que o conteúdo proteico de uma metade do gel fosse transferido para membrana de PVDF, seguido de *western-blotting* (seção 4.10.3), enquanto a outra parte “espelho” fosse corada com corante azul de Coomassie. Essa estratégia permitiu a demarcação das bandas-alvo na membrana de *western-blotting* por meio da sobreposição da mesma ao filme de raio-X revelado. Por sua vez, a membrana foi utilizada como *template* para o gel de poliacrilamida corado, a fim de recortar as bandas de proteína nas regiões apropriadas.

##### 4.10.4.2 Preparo de amostras e análise de MALDI-TOF

Depois de extraídas do gel com o auxílio de uma lâmina, as bandas foram descoradas em microtubos por sucessivas lavagens com uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e 50% de acetonitrila e, em seguida, os fragmentos foram desidratados com acetonitrila

100%. Para a etapa de digestão, os tubos foram mantidos em gelo com solução de tripsina 15 ng/ $\mu$ L em tampão bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e acetonitrila 10% durante 30 minutos, seguido de incubação por 16 horas a 33°C. Após esse período, 1  $\mu$ L do sistema de digestão foi misturado com 1  $\mu$ L de uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoracético 0,1% (v/v) saturada com a matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico). As amostras foram então aplicadas em uma placa de MALDI e secadas ao ar para remoção dos solventes. Os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex maX. A aquisição das massas foi realizada no modo positivo utilizando voltagem de 20 kV. A lista de picos foi criada usando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). A identificação das proteínas foi realizada usando o software Mascot 2.2 (Matrix Science) e o banco de dados de proteínas de *A. brasilense* Sp245 (WISNIEWSKI-DYE *et al.*, 2011); adicionalmente, a busca por fragmentos compatíveis com as proteínas de interesse foi feita também em uma tabela customizada do Microsoft Excel, após a digestão *in silico* das proteínas de interesse usando o programa PeptideMass (WILKINS *et al.*, 1997).

#### **4.11 Ensaios de atividade enzimática**

##### **4.11.1 Determinação de atividade da nitrogenase em *A. brasilense***

Os ensaios para determinação de atividade da nitrogenase foram realizados pelo método de redução de acetileno a etileno, conforme descrito por Dilworth (1966) e Schollhorn e Burrell (1967), e modificado por Klassen e colaboradores (1997). As estirpes de *A. brasilense* de interesse foram inicialmente cultivadas em 3 mL de meio NFbHPN-lactato na presença dos devidos antibióticos a 30°C e 200 rpm, *overnight*. Comumente, o meio de cultivo foi suplementado com 2 mM de glutamina para o cultivo das estirpes excretoras de amônio. Ao final do tempo de incubação, 30  $\mu$ L das culturas crescidas foram usados para inocular frascos de 7 mL contendo 3 mL de meio NFbHPN-lactato semi-sólido sem antibióticos e na presença de diferentes concentrações de amônio, glutamina ou glutamato, de acordo com a necessidade do experimento. Os inóculos foram feitos perfurando o meio semi-sólido em um ponto próximo ao centro do frasco e despejando os 30  $\mu$ L de cultura líquida o mais próximo possível do fundo do frasco. Após cultivo estático a 30°C por cerca de 24 horas, os frascos foram vedados com rolhas de borracha do tipo *suba-seal* e injetados com uma alíquota de acetileno usando uma seringa (10% do volume da fase gasosa do frasco), sendo novamente incubados a 30°C por 1 hora. Em seguida, amostras de 1 mL da fase gasosa foram coletadas para análise de etileno formado por cromatografia gasosa em equipamento Perkin Elmer Clarus GC480. Após o ensaio, as culturas em meio semi-sólido foram homogeneizadas por agitação, e pelo menos duas

alíquotas de cada cultura foram submetidas à lise com 0,2 M de NaOH para posterior dosagem de proteínas, conforme descrito na seção 4.10.1. Os resultados dos ensaios de determinação de atividade da nitrogenase foram expressos em nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura.

#### **4.11.2 Ensaio de *switch on/off* da nitrogenase**

Para os ensaios de desligamento-religamento da nitrogenase, as estirpes de interesse foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio NFbHPN-lactato na presença de 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl e dos devidos antibióticos a 30°C e 120 rpm, *overnight*. Após atingir a saturação, 120 µL de cada cultura foram utilizados para re-inocular frascos de 125 mL contendo 20 mL de meio NFbHPN-lactato com 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl mais antibióticos, os quais foram então incubados a 30°C e 120 rpm por cerca de 18 horas. No dia seguinte, as culturas foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 50 mL e as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sedimentos resultantes foram ressuspensos em 4 mL de meio NFbHPN-lactato (livre de nitrogênio), e as suspensões foram usadas para inocular frascos de 36 mL contendo 6,55 mL de meio NFbHPN-lactato para uma D.O.<sub>600nm</sub> inicial igual a 0,3. Em seguida, as tampas de espuma foram substituídas por rolhas de borracha do tipo *suba-seal* e foi realizada a troca da atmosfera gasosa dos frascos por argônio durante cerca de 25 minutos em fluxo lento e contínuo. Após ajuste da concentração de oxigênio da fase gasosa para 6%, os frascos foram incubados a 30°C e 120 rpm por 4 horas para desreprimir as células para atividade da nitrogenase. O ensaio foi iniciado pela adição de acetileno em uma proporção correspondente a 10% do volume da fase gasosa (655 µL). Alíquotas gasosas foram coletadas 20 e 40 minutos após a adição do substrato. Em seguida, foi dado choque de amônio às células por meio da adição de 200 µM de NH<sub>4</sub>Cl, e novas alíquotas gasosas foram coletadas 5, 10, 20, 40 e 90 minutos após o choque. As culturas foram mantidas em shaker a 30°C e 120 rpm durante todo o curso do ensaio, sendo somente retiradas para coleta dos produtos. A análise de etileno formado foi feita por cromatografia gasosa em equipamento Perkin Elmer Clarus GC480, assim como descrito na seção 4.11.1.

#### **4.11.3 Determinação de atividade da glutamina sintetase (GS)**

##### **4.11.3.1 Condições de cultivo para ensaio de atividade da GS**

Para os ensaios de determinação de atividade da glutamina sintetase, colônias isoladas das estirpes de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio NFbHPN-lactato contendo 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl e 2 mM de glutamina na presença dos antibióticos apropriados, e os frascos foram

incubados a 30°C e 120 rpm por aproximadamente 24 horas. Ao final do período de incubação, as culturas foram utilizadas para re-inocular 20 mL de meio NFbHP-lactato contendo 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl e 2 mM de glutamina na presença dos antibióticos apropriados. Após cerca de 18 horas de crescimento a 30°C e 120 rpm, as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 4.000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo os *pellets* obtidos ressuspendidos lentamente em 4 mL de meio NFbHP-lactato livre de amônio. Em seguida, foi determinada a D.O.<sub>600nm</sub> das suspensões bacterianas (medida com caminho óptico l = 1 cm), as quais foram utilizadas para inocular frascos de 36 mL contendo 6,55 mL de meio NFbHP-lactato livre de amônio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl para uma D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0,3. Os frascos foram vedados com tampas de borracha do tipo *suba-seal* para troca gasosa por argônio por 25 minutos, e a concentração de oxigênio da fase gasosa foi ajustada para 6%. Os frascos foram então incubados a 30°C e 120 rpm por 4 horas antes do início dos ensaios de determinação de atividade da GS.

#### **4.11.3.2 Preparo dos permeabilizados celulares para atividade de GS**

Para o preparo dos permeabilizados celulares, 660 µL de CTAB (1 mg/mL) foram adicionados às culturas bacterianas (para concentração final de 100 µg/mL) e homogeneizados por inversão, seguido de incubação dos frascos a 30°C e 120 rpm por 5 minutos. Após o período de incubação, as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas a 4.000 rpm e 4°C por 5 minutos, sendo os *pellets* resultantes ressuspendidos em 3 mL de solução de KCl 1% gelada. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm e 4°C por 10 minutos e os *pellets* ressuspendidos em 500 µL de solução de KCl 1% gelada. Os permeabilizados foram mantidos em gelo durante o preparo das reações enzimáticas.

#### **4.11.3.3 Atividade transferásica de GS**

Para a determinação da atividade transferásica (GST), os sistemas de reação foram preparados como descrito por Bender e colaboradores (1977) com algumas modificações, e continham os seguintes componentes e concentrações: tampão HEPES 100 mM pH 7,66, cloreto de hidroxilamina 20 mM, cloreto de manganês 0,3 mM, arseniato de sódio 25 mM pH 7,66, ADP 0,36 mM e CTAB 90 µg/mL. As reações foram preparadas em microtubos de 2 mL com 400 µL do sistema supramencionado e 50 µL de cada permeabilizado celular (4.11.3.2). Os tubos foram então equilibrados a 37°C por 5 minutos em banho-maria e as reações foram iniciadas pela adição de 50 µL de solução de glutamina 0,2 M, em capela de exaustão. Após 40 minutos incubação, as reações foram paradas pela adição de 1 mL de solução de parada (cloreto férrico hexahidratado 55 g/L, ácido tricloroacético 20 g/L e ácido clorídrico concentrado 21

mL/L). Os tubos foram agitados e centrifugados a 14.500 rpm por 5 minutos, sendo 200  $\mu$ L dos sobrenadantes analisados por espectrofotometria a 540 nm em leitor de microplacas CLARIOstar (BMG Labtech). Os brancos para cada genótipo foram preparados pela adição dos mesmos componentes supramencionados, porém substituindo ADP e arseniato de sódio por água. Para estimar a concentração dos produtos formados, foi feita uma curva padrão com concentrações crescentes de solução estoque de  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato (LGH) variando de 0-20 mM em sistemas de reação de 500  $\mu$ L, e as leituras foram analogamente feitas a 540 nm. A curva padrão foi gerada plotando os valores de concentração de LGH na abscissa contra os valores encontrados para média das absorbâncias na ordenada, seguida da geração de um modelo linear no programa Microsoft Excel; curvas com valor de  $R^2$  superior a 0,98 foram consideradas adequadas. Para determinação da fração fisiologicamente ativa de GS (não adenililada), o sistema foi acrescido de 60 mM de cloreto de magnésio, o qual inibe a fração adenililada. A porcentagem de adenililação dos monômeros de GS foi determinada através da relação entre a atividade de GS na presença de  $Mg^{2+}$  (fração adenililada) e na ausência de  $Mg^{2+}$  (transferásica total). Os resultados de atividade transferásica foram expressos em nmol de LGH formado por miligrama de proteína total por minuto.

#### **4.11.4 Determinação de atividade da $\beta$ -galactosidase em *E. coli***

##### **4.11.4.1 Condições de cultivo para ensaio de $\beta$ -galactosidase**

Para os experimentos de determinação de atividade de  $\beta$ -galactosidase, células de *E. coli* ET8000 contendo o plasmídeo pRT22 (fusão traducional *nifH::lacZ*) e os plasmídeos codificantes para as variantes de NifA (construções em pPR34), foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio L contendo os antibióticos apropriados a 37°C e 250 rpm, *overnight*. Após esse período, 75  $\mu$ L de cada cultura foram transferidos para frascos contendo 6 mL de meio NFDM suplementado com 7,56 mM de  $(NH_4)_2SO_4$  (condição de alto amônio) ou 0,02 % de solução de caseína hidrolisada (condição de baixo amônio), mais os antibióticos necessários e em anaerobiose. As culturas foram incubadas a 30°C e 250 rpm por cerca de 20 horas, antes do início do ensaio.

Para os experimentos de determinação de atividade de  $\beta$ -galactosidase em *E. coli* JM109, células contendo o plasmídeo pRT22 (fusão traducional *nifH::lacZ*) e os plasmídeos codificantes para as variantes de NifA (construções em pET28a), foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio L contendo os antibióticos apropriados a 37°C e 250 rpm, *overnight*. Após esse período, 125  $\mu$ L de cada cultura foram transferidos para frascos contendo 10 mL de meio NFDM suplementado com 20 mM de  $NH_4Cl$ , 3% de LB e os antibióticos apropriados. As

culturas foram então incubadas a 37°C e 250 rpm por cerca de 24 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente e lavadas com meio NFDM livre de amônio. As suspensões obtidas foram diluídas para uma D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0,2 (medida com caminho óptico l = 1 cm) em 4 mL de meio NFDM suplementado com 0,02% de caseína hidrolisada (condição de baixo amônio) ou 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio), mais os antibióticos adequados. Além disso, 5 µM do indutor IPTG foram adicionados às culturas. Após a preparação dos frascos, as tampas rosqueáveis foram substituídas por rolhas de borracha do tipo *suba-seal* e foi feita a troca de ar por gás nitrogênio durante 30 minutos, a fim de obter-se um sistema anaeróbico. Após a troca gasosa, os frascos foram incubados a 30°C e 180 rpm por 6 horas, antes da determinação da atividade enzimática.

#### 4.11.4.2 Ensaio de atividade da β-galactosidase

Os ensaios de determinação de atividade da β-galactosidase foram realizados conforme descrito por Miller (1972), com poucas modificações. Para isso, alíquotas de 100 µL das culturas foram adicionadas a 900 µL de tampão Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM e SDS 0,0027%, pH 7,0). Em seguida, foram adicionados 25 µL de clorofórmio e os tubos foram agitados por cerca de 5 segundos. Para equilibrar a temperatura, os tubos foram transferidos para banho-maria a 30°C por 5 minutos e, em seguida, o início da reação enzimática foi disparado pela adição de 200 µL do substrato *o*-nitrofenil β-D-galactosídeo (ONPG) a 4 mg/mL, preparado em tampão Z. Após a adição de ONPG ao primeiro tubo, o tempo começou a ser cronometrado e as reações foram interrompidas entre 1-30 minutos após aparecimento de uma coloração amarelada através da adição de 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm por 5 minutos e 200 µL do sobrenadante foram analisados por espectrofotometria a 415 nm e 550 nm, a fim de determinar a quantidade do produto *o*-nitrofenil (produto da degradação de ONPG) e de debris celulares, respectivamente, utilizando leitor de microplaca CLARIOstar (BMG Labtech). As atividades foram expressas em unidades Miller, utilizando a seguinte equação:

$$\frac{1000 (D_{0415} - 1,75(D_{0550}))}{(\text{volume})(D_{0595})(\text{tempo de reação})}$$

Os cálculos foram feitos utilizando dados de duplicatas biológicas e técnicas.

#### 4.12 Quantificação de amônio excretado em culturas

Para os experimentos de dosagem de amônio, colônias isoladas foram crescidas em 3 mL de meio NFbHPN-lactato líquido contendo os antibióticos apropriados e comumente suplementado com 2 mM de glutamina, a 30°C e 200 rpm, *overnight*. Após o período de incubação, 30 µL das culturas foram utilizados para inocular frascos contendo 3 mL de meio NFbHPN-lactato semi-sólido sem antibióticos, os quais foram incubados a 30°C sem agitação. Amostras foram tipicamente coletadas em intervalos de 24 horas (24, 48, 72, 96 e 120 horas) e utilizadas para quantificação de amônio excretado. Para isso, os frascos foram vortexados e 1 mL de cada cultura foi centrifugado por 1 minuto a 14.500 rpm. Volumes de 100 µL de sobrenadante foram utilizados para quantificação de amônio usando o método do indofenol-azul, o qual emprega reação entre amônia, fenol e hipoclorito em meio alcalino (CHANEY e MARBACH, 1962). Os sistemas de reação foram montados em microtubos e continham 150 µL de solução de sódio fenol (0,5 M fenol e 0,6 M NaOH), 225 µL de solução nitroprussiato de sódio (10 g/L), 225 µL de solução de hipoclorito de sódio (1-1,5%) e 750 µL de amostra (100 µL de sobrenadante diluídos em 650 µL de água). Após 40 minutos de reação à temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorbância dos produtos formados a 625 nm em um espectrofotômetro CLARIOstar (BMG Labtech), utilizando placas de ELISA de 96 poços. As concentrações foram calculadas utilizando uma curva de calibração determinada (com uma solução de NH<sub>4</sub>Cl 1 mM) para cada experimento de quantificação, e os resultados foram expressos em milimol de amônio excretado. Aliquotas de cada cultura foram congeladas, a fim de determinar-se o conteúdo proteico para normalização dos dados (seção 4.10.1).

#### 4.13 Cromatografia em camada delgada para identificação de aminoácidos

##### 4.13.1 Preparo de amostras

As estirpes de interesse foram cultivadas em 5 mL de meio NFbHPN-lactato contendo os antibióticos apropriados e suplementado com 2 mM de glutamina a 30°C e 120 rpm até atingir a saturação. Após período de crescimento, 30 µL de cada cultura foram utilizados para inocular frascos contendo 3 mL de meio NFbHPN-lactato semi-sólido sem antibióticos, os quais foram incubados a 30°C. Aliquotas de 1 mL das culturas semi-sólidas foram coletadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação e centrifugadas a 14.500 rpm por 30 minutos, a fim de separar o ágar da fração a ser analisada.

#### 4.13.2 Cromatografia e revelação de sílica

Para as análises cromatográficas em camada delgada, inicialmente foi feito um traço com o auxílio de um lápis ao longo do comprimento maior de uma folha de sílica TLC Silica gel 60, 20x20 cm) à 2 cm da borda. Em seguida, foram marcados pontos sobre o traço 1 cm equidistantes, onde 2  $\mu\text{L}$  das amostras preparadas no item 4.13.1 foram depositados com o auxílio de uma ponteira de 10  $\mu\text{L}$ , de forma que a manchas sobre a sílica tivessem o menor diâmetro possível. Depois de seca em estufa a 100°C por 1 minuto, mais 2  $\mu\text{L}$  das amostras foram aplicadas sobre a mesma região da sílica, a qual foi novamente seca a 100°C por 1 minuto. O procedimento foi repetido até que um total de 10  $\mu\text{L}$  das amostras tivesse sido adicionado à linha de base. Padrões dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina nas concentrações de 6,84, 5, 2, 1 e 0,1 mM foram utilizados, bem como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 1, 10 e 100 mM (4  $\mu\text{L}$  de cada no total), a fim de verificar o limite de detecção da técnica nas condições testadas. Depois de seca, a folha sílica contendo as amostras foi depositada em câmara previamente saturada com a fase móvel por 30 minutos, a qual foi composta de butanol:ácido acético:água (3:1:1, v:v:v), e a separação foi feita por aproximadamente 45 minutos. Após o deslocamento da fase móvel até uma distância correspondente a 1 cm do limite superior da sílica, a folha foi secada a 100°C por cerca de 5 minutos para remover completamente o solvente e revelada com solução de ninidrina (0,1% em acetona). O  $R_f$  (razão de fluxo) foi determinado pela razão entre a distância percorrida pela amostra (cm) e a distância percorrida pela fase móvel (cm).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

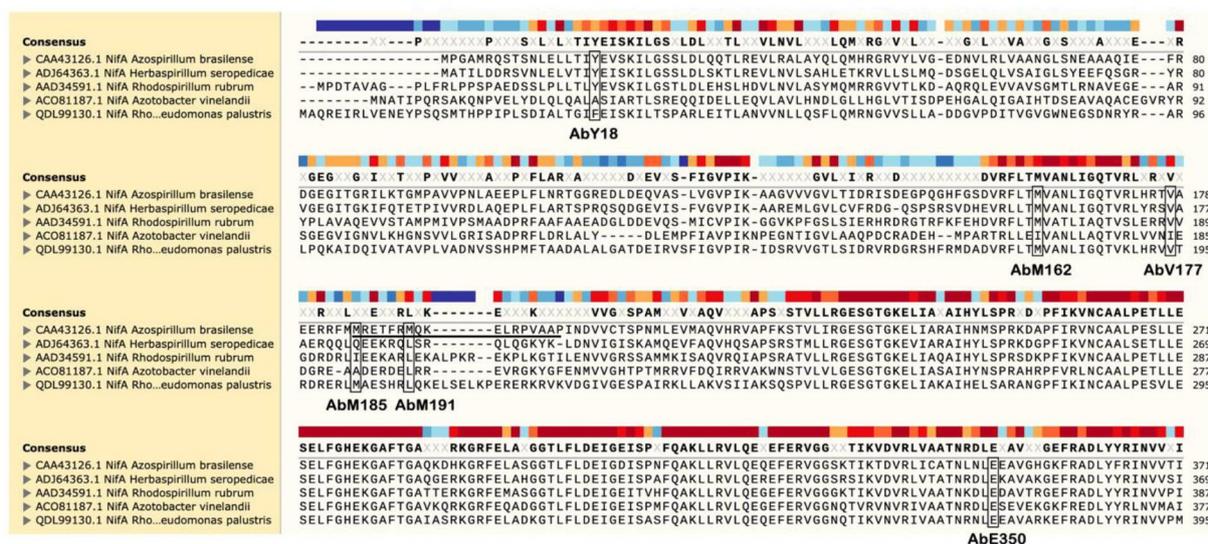
### 5.1 Avaliação do efeito da mutagênese de NifA em *E. coli*

Tendo em vista que a proteína NifA é o regulador central da transcrição dos genes *nif* relacionados à FBN em organismos diazotróficos, diversos estudos têm buscado entender os mecanismos pelos quais o domínio GAF exerce influência sobre os demais domínios, alterando a atividade da proteína em resposta à disponibilidade de PII e nitrogênio intracelular. Como discutido anteriormente, diversas variantes de NifA contendo mutações pontuais nas regiões que compreendem o domínio GAF e a região de interdomínios QL, originalmente identificadas em organismos como *A. vinelandii* (REYES-RAMIREZ *et al.*, 2002), *R. rubrum* (ZOU *et al.*, 2008), *H. seropedicae* (STEFANELLO, 2018) e *R. palustris* (REY *et al.*, 2007), têm mostrado serem ativas mesmo na ausência de PII e/ou de forma não responsiva aos níveis de amônio.

Considerando a similaridade de função e de sequência observada entre os domínios GAF N-terminais de proteínas NifA de proteobactérias, é razoável supor que mutações ativadoras identificadas em um microrganismo possam ser transferidas para outro e nele gerar o mesmo fenótipo, caso a similaridade de sequência gere uma similaridade no mecanismo de regulação de NifA por seu domínio GAF. Por isto, com o intuito de melhor entender a regulação da atividade de NifA em *A. brasilense*, e com intenção de obter possíveis variantes constitutivas que permitissem a ocorrência de FBN na presença de amônio, nesta seção foi avaliada a influência de algumas dessas mutações em *AbNifA*. Um alinhamento de sequências de proteína entre *AbNifA* e as proteínas NifA nas quais as mutações de interesse foram identificadas foi usado para encontrar os resíduos de aminoácidos equivalentes para mutagênese em *AbNifA*; as substituições propostas foram: M162V (M173V em *R. rubrum*), E350K (E356K em *A. vinelandii*), V177G (V176G em *H. seropedicae*), M185P (Q184P em *H. seropedicae*), M191P (L190P em *H. seropedicae*) e Y18F (*A. brasilense*, ARSÈNE *et al.*, 1999). Além disso, foi avaliado o efeito de duas deleções na região de interdomínios QL: resíduos 185-199 e 185-201 (McKINLAY *et al.*, 2010), com 15 e 17 aminoácidos deletados, respectivamente.

A Figura 9 abaixo mostra o resultado parcial desse alinhamento de diversas proteínas NifA, destacando a região que abrange os resíduos 1-371 da sequência de *AbNifA*, onde estão localizados os resíduos alvo de mutagênese neste estudo. O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo ClustalW no programa MEGAX (KUMAR *et al.*, 2018), conforme descrito na seção 4.4.1. É possível observar que dentre os aminoácidos selecionados, o resíduo de E350 da proteína *AbNifA* apresenta a maior conservação entre os organismos, enquanto o resíduo M185 é o menos conservado. Além disso, dois dos resíduos de aminoácidos selecionados, M185 e M191 estão inseridos dentro da mesma região de interdomínios QL alvo de deleção (185-201).

**Figura 9 - Alinhamento parcial de proteínas NifA destacando os resíduos alvos de mutagênese neste estudo**



As seqüências de aminoácidos das proteínas NifA dos organismos *A. brasilense*, *H. seropedicae*, *R. rubrum*, *A. vinelandii* e *R. palustris*, obtidas a partir do banco de dados de proteínas do NCBI, foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW no programa MEGAX. Os parâmetros padrão foram mantidos para o alinhamento múltiplo de seqüências (Gonnet matrix, residue-specific penalties ON, hydrophilic penalties ON, gap separation matrix 4). No resultado do alinhamento parcial é mostrada a região que compreende os resíduos 1-371 de *AbNifA*. Os resíduos de aminoácidos substituídos para a construção de variantes de NifA encontram-se destacados em caixas pretas. A região sublinhada corresponde aos resíduos Met(185)-Pro(201) deletados do Q-linker. Consensus representa a seqüência consenso de aminoácidos do alinhamento. O mapa de calor destaca as regiões de conservação, variando de azul escuro (menos conservado) para vermelho escuro (mais conservado).

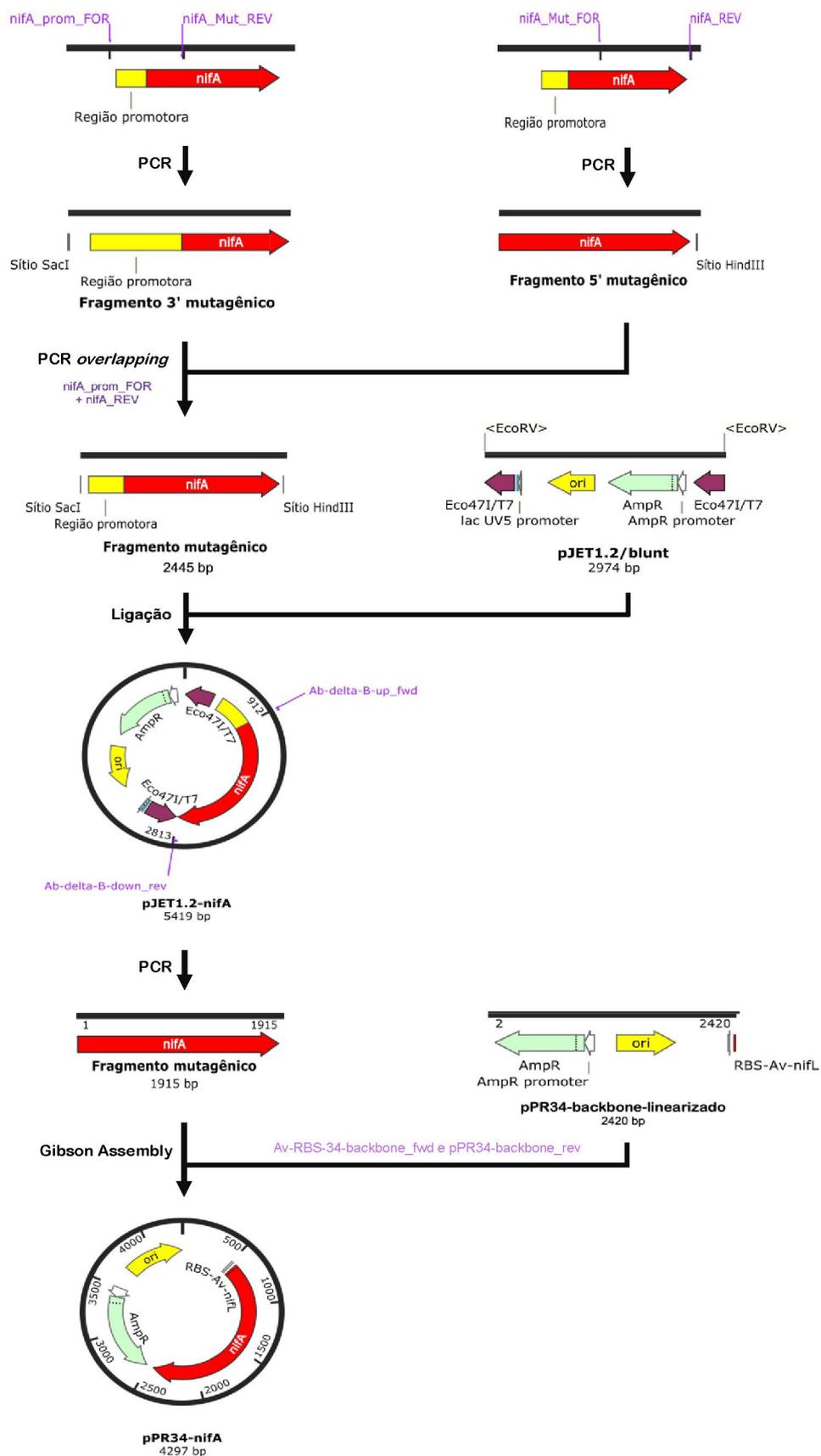
### 5.1.1 Construção de plasmídeos para expressão de variantes de NifA em *E. coli*

Para construir os plasmídeos expressando as variantes pontuais de NifA, inicialmente foi feita a amplificação mutagênica do gene *nifA* a partir do DNA gênomico da estirpe FP2, utilizando a estratégia de mutagênese dirigida por oligonucleotídeos (HO *et al.*, 1989), conforme descrito na seção 4.5.9. A inserção de mutações pontuais em códons específicos foi dirigida por *primers* mutagênicos, os quais foram usados para amplificar o gene *nifA* em dois fragmentos com região de complementariedade (fragmentos 5' e 3' mutagênicos). Numa segunda etapa, os fragmentos foram ligados em uma reação de PCR *overlapping* utilizando um par de *primers* externos (*nifA\_prom\_FOR* e *nifA\_REV*) comum a todas as amplificações, gerando o gene completo com as mutações desejadas. Os produtos das amplificações mutagênicas apresentavam 2455 pb, equivalentes ao gene *nifA* e 540 pb do seu promotor, e foram clonados sem digestão prévia ao vetor de captura pJET1.2/*blunt*, o qual contém um gene que codifica uma enzima de restrição letal (*eco47IR*) que é interrompido pela ligação de insertos de DNA no sítio múltiplo de clonagem (MCS). Como resultado, somente bactérias contendo plasmídeos recombinantes são capazes de formar colônias. A primeira etapa da confirmação de clones foi feita por análise de restrição com *BglIII*, já que o vetor contém dois sítios para essa

enzima flanqueando o inserto clonado. A digestão gerou os fragmentos teóricos esperados de 2928 pb e 2491 pb, correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Em seguida, foi feito o sequenciamento dos plasmídeos com os *primers* nifA\_FOR\_2, nifA\_V177G\_FOR, pJET1.2-fwd e pJET1.2-rev, a fim de checar a correta inserção das mutações nos códons alvo e a ausência do aparecimento de mutações indesejadas. Os plasmídeos obtidos foram nomeados pTMA1401, pTMA1402, pTMA1403, pTMA1404, pTMA1405 e pTMA1406, e contêm o promotor e o gene *nifA* nativo ou codificando as mutações M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, respectivamente, clonados em pJET2.1.

A fim de expressar as variantes de *AbNifA* em *E. coli* ET8000, os fragmentos mutagenizados foram subclonados no vetor pPR34 (SÖDERBÄCK *et al.*, 1998). Este vetor corresponde ao plasmídeo pT7-7 contendo o RBS de *nifL* de *A. vinelandii*, e faz com que os níveis de expressão proteicos sejam menores em *E. coli* quando comparados com os promovidos pelo RBS do vetor pT7-7. Para isso, foi feita a amplificação das variantes de *nifA* a partir das construções em pJET1.2/*blunt* utilizando os *primers* Ab-delta-B-up\_fwd e Ab-delta-B-down\_rev, e os produtos (1915 pb) foram adicionados ao vetor pPR34 linearizado por PCR sem os genes *nifAL* de *A. vinelandii* (2420 pb) (*primers* Av-RBS-34-backbone\_fwd e pPR34-backbone\_rev), utilizando a técnica de Gibson Assembly (GIBSON *et al.*, 2009), conforme descrito na seção 4.5.8.1. A confirmação dos plasmídeos gerados foi feita por análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, a fim de visualizar os fragmentos teóricos esperados de 2417 pb e 1880 pb, correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Os plasmídeos obtidos foram nomeados pTMA1601, pTMA1602, pTMA1603, pTMA1606, pTMA1607, pTMA1608, pTMA1609 e pTMA1610, e expressam NifA de *A. brasilense* nativa ou contendo as mutações Y18F, Y18F+M162V, M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, respectivamente, a partir do promotor T7 de pT7-7 e do rbs de *nifLA* de *A. vinelandii*. Um esquema representativo da estratégia utilizada para a obtenção das construções em pJET1.2 e pPR34 é mostrado na Figura 10.

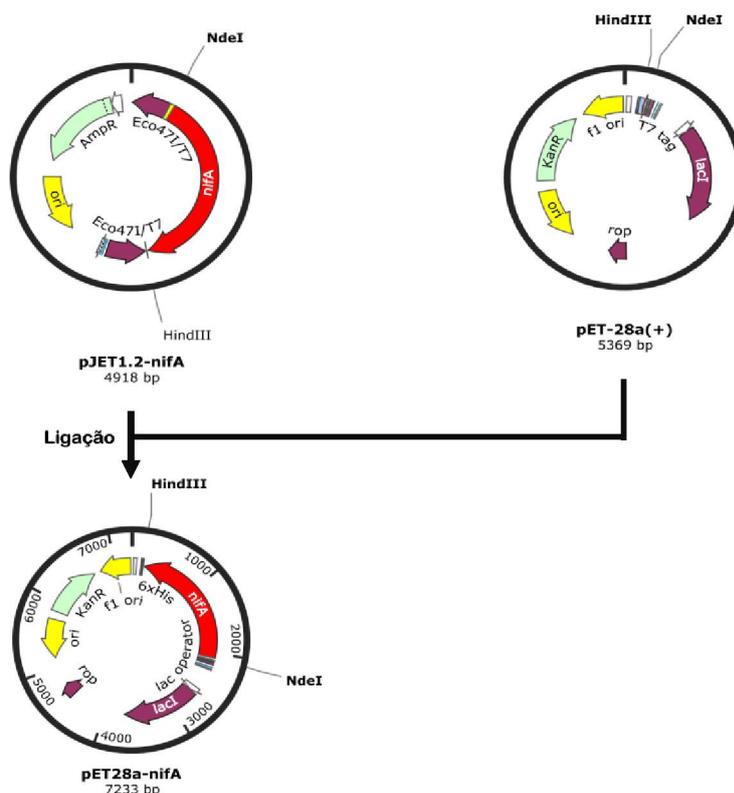
**Figura 10 - Representação esquemática da estratégia utilizada para obtenção de variantes pontuais de NifA expressas a partir de pPR34**



A inserção das mutações pontuais foi feita através da amplificação do gene *nifA* e sua região promotora (representados em vermelho e amarelo, respectivamente) em dois fragmentos separados utilizando dois pares de *primers* mutagênicos (mostrados em lilás), os quais foram posteriormente ligados em uma reação de PCR *overlapping*. Os fragmentos resultantes foram clonados em pJET1.2/*blunt*, e então subclonados em pPR34 *backbone* linearizado por PCR sem os genes *nifAL* de *A. vinelandii*. Os *primers* *nifA\_Mut\_FOR* e *nifA\_Mut\_REV* são representações dos *primers* 5' e 3' mutagênicos, respectivamente. Os vetores pJET1.2-*nifA* e pPR34-*nifA* são representações dos plasmídeos pTMA1401-1406 e pTMA1601-1610 (exceto pTMA1604 e pTMA1605), respectivamente (descrição detalhada na Tabela 2). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada etapa são indicados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9. O desenho do esquema de clonagem foi feito no programa SnapGene (Dotmatics).

Para a expressão das variantes pontuais de *AbNifA* em *E. coli* JM109, as construções pTMA1501-pTMA1505, pTMA1602, pTMA1603 e pTMA1609 (ver Tabela 2) contendo os fragmentos de *nifA* foram digeridas com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, e os produtos de tamanho adequado (1927 pb) subclonados em vetor pET28a digerido com as mesmas enzimas (Figura 11). A escolha do vetor foi baseada em experimentos anteriores, nos quais foi possível detectar a ativação de uma fusão traducional (*nifH::lacZ*) por meio da expressão de uma variante de *AbNifA* N-truncada em *E. coli* JM109 a partir de pET28a (NISHIKAWA, 2010). A confirmação dos plasmídeos construídos foi feita por digestão com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, que geraram os fragmentos teóricos esperados de 5027 pb e 2026 pb, correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Os novos plasmídeos foram nomeados pTMA1701, pTMA1702, pTMA1703, pTMA1706, pTMA1707, pTMA1708, pTMA1709 e pTMA1710, e expressam *NifA* de *A. brasilense* nativa ou contendo as mutações Y18F, Y18F+M162V, M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, respectivamente, bem como uma cauda de polihistidina N-terminal, a partir do promotor *lacO-T7* do vetor pET28a. A Figura 11 mostra uma representação esquemática de sua construção.

**Figura 11 - Representação esquemática da estratégia utilizada para obtenção de variantes pontuais de NifA expressas a partir de pET28a**



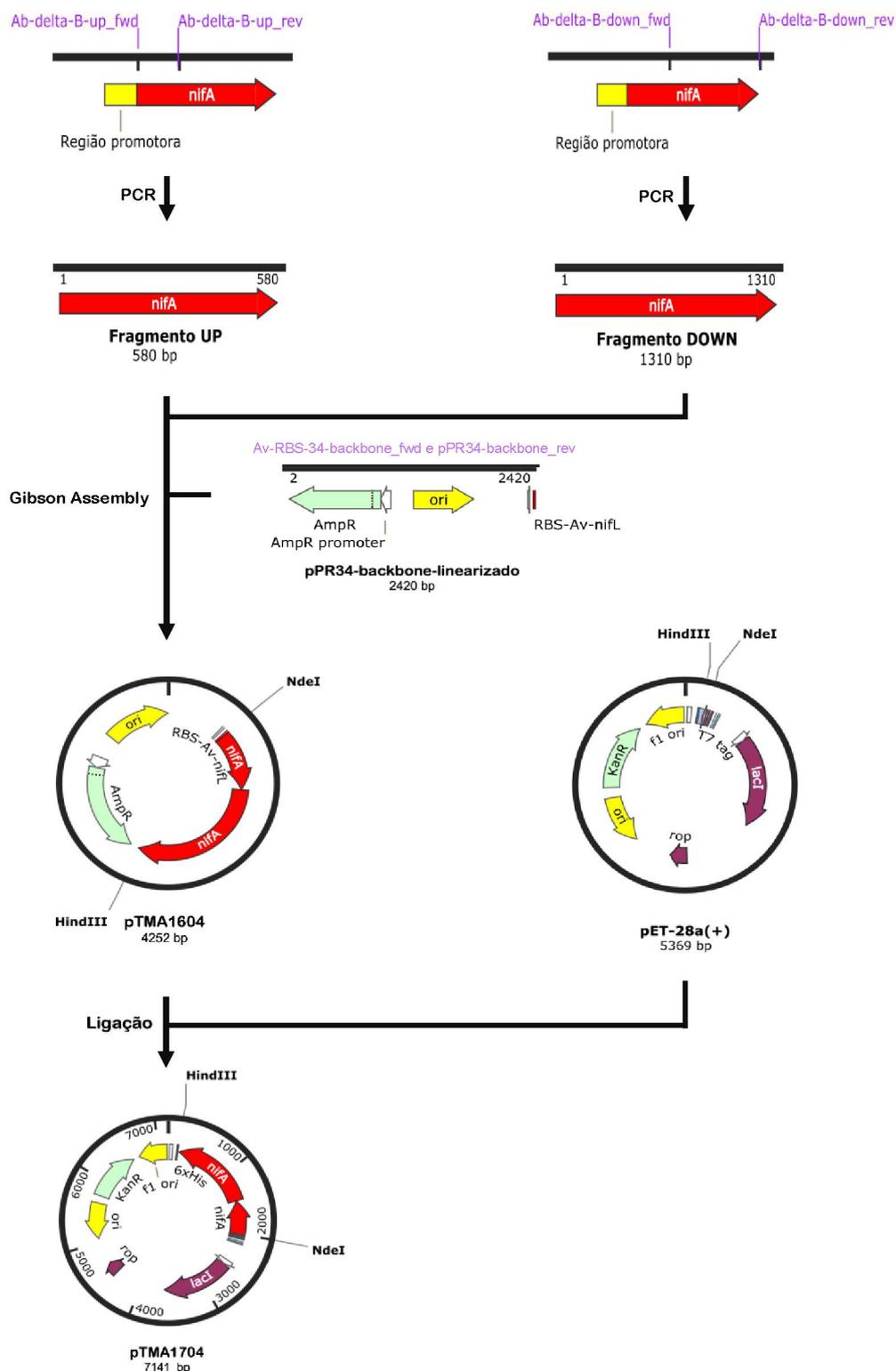
Construções em pJET1.2 ou pPR34 contendo o gene *nifA* nativo ou com mutações pontuais em diferentes códons (representado em vermelho) foram digeridas com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*. Os produtos obtidos foram purificados do gel e adicionados ao vetor de expressão pET28a, digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos resultantes expressam as variantes de NifA, bem como uma cauda de polihistidina N-terminal, sob controle do promotor T7 e foram utilizados para os ensaios de ativação transcricional em *E. coli* JM109. Os vetores pET1.2-*nifA* e pET28a-*nifA* são representações dos plasmídeos pTMA1501-1505 e pTMA1701-1710 (exceto pTMA1704 e pTMA 1705), respectivamente (descrição detalhada na Tabela 2).

Para a obtenção dos plasmídeos expressando as duas variantes de NifA contendo deleção de parte da região de interdomínios QL, os fragmentos resultantes da amplificação das regiões localizadas à montante (UP) (*primers* Ab-delta-B-up\_fwd/Ab-delta-B-up\_rev para QL1; Ab-delta-B-up\_fwd/Ab-B-del-2-up\_rev para QL2) e à jusante (DOWN) (Ab-delta-B-down\_fwd/Ab-delta-B-down\_rev para QL1; Ab-B-del-2-down\_fwd/Ab-delta-B-down\_rev para QL2) das regiões alvo de deleção foram adicionados ao vetor pPR34 linearizado por PCR sem os genes *nifAL* de *A. vinelandii* (*primers* Av-RBS-34-backbone\_fwd e pPR34-backbone\_rev), utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). A confirmação dos plasmídeos construídos foi feita por digestão dos mesmos com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, que geraram os fragmentos teóricos esperados de 2417 pb e 1835 pb (construção de QL1), ou 2417 e 1829 pb (construção de QL2), correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Além disso, foi feita confirmação por reação de sequenciamento utilizando os *primers* Ab-delta-B-up\_fwd e Ab-delta-B-down\_rev. Os plasmídeos gerados foram

denominados pTMA1604 e pTMA1605, e expressam a proteína NifA contendo deleção dos resíduos 185-199 (QL1-NifA) e 185-201 (QL2-NifA), respectivamente, sob controle de promotor T7.

Para os ensaios de avaliação de atividade destas duas variantes em *E. coli* JM109 (DE3), as construções em pPR34 foram digeridas com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, e o produto ligado ao vetor pET28a digerido com as mesmas enzimas. A presença dos insertos de tamanho correto foi confirmada após restrição com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, que produziram os fragmentos teóricos esperados de 5304 pb e 1837 pb (construção de QL1), ou 5304 pb e 1831 pb (construção de QL2), correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Os plasmídeos resultantes foram denominados pTMA1704 e pTMA1705, e expressam a proteína NifA contendo uma cauda de polihistidina N-terminal e a deleção dos resíduos 185-199 e 185-201, respectivamente, sob controle do promotor *lacO-T7* do vetor pET28a. Uma representação esquemática das etapas de clonagem para a construção dos vetores expressando a variante QL1-NifA é mostrada na Figura 12.

**Figura 12 - Representação esquemática da construção de vetores expressando NifA truncada em parte do Q-linker**



Os fragmentos resultantes da amplificação das regiões localizadas à montante (fragmento UP) e à jusante (fragmento DOWN) do Q-linker de NifA foram ligados ao vetor pPR34 backbone linearizado por PCR (excluindo os genes *nifA*L de *A. vinelandii*), em uma reação única utilizando a técnica de Gibson Assembly. Na sequência, o plasmídeo resultante, pTMA1604, foi digerido com as enzimas *NdeI* e *HindIII* e o inserto liberado subclonado em pET28a digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo gerado, pTMA1704, expressa NifA truncada nos resíduos 185-199 e contendo uma cauda de polihistidina N-terminal a partir do

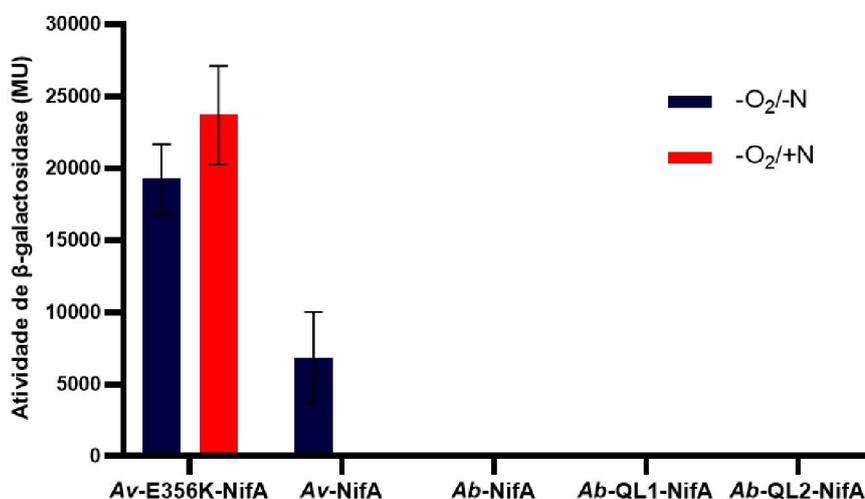
promotor T7. A construção dos plasmídeos pTMA1605 e pTMA1705 que expressam NifA deletada nos resíduos 185-201 a partir dos vetores pPR34 e pET28a, respectivamente, foi feita de maneira análoga. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada etapa são indicados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9.

### 5.1.2 Avaliação da ativação de uma fusão transcricional por variantes de NifA em *E. coli* ET8000

Os plasmídeos pPR34, pPMA e pTMA1601-pTMA1610 (que expressam *AvNifL* + *AvNifA*, *AvNifL* + *AvE356K-NifA*, *AbNifA* e as variantes Y18F, Y18F+M162V, QL1, QL2, M162V, E350K, V177G, M185P e M191P) foram transformados em células de *E. coli* ET8000 carregando o plasmídeo repórter pRT22 (TULI e MERRICK, 1988), o qual possui uma fusão traducional *nifH::lacZ* de *K. pneumoniae*. Uma vez que a expressão dos genes estruturais *nifHDK* da nitrogenase está sob controle de NifA, a expressão do gene repórter *lacZ* ocasionada pela transcrição a partir do promotor dos genes *nif* pode ser tomada como medida da atividade da proteína NifA.

Os transformantes foram cultivados em meio NFDM contendo alto amônio (7,56 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ou baixo amônio (0,02% de solução caseína hidrolisada) para a realização dos ensaios de atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase, conforme descrito na seção 4.11.4. Os experimentos foram feitos em condições de anaerobiose (conforme descrito na seção 4.11.4.1), já que a atividade de *AbNifA* é regulada negativamente sob altas concentrações de oxigênio (SOTOMAIOR *et al.*, 2012). Os resultados são mostrados na Figura 13.

**Figura 13 - Atividade de  $\beta$ -galactosidase em culturas de *E. coli* ET8000 expressando variantes de *AbNifA***



Células de *E. coli* ET8000 contendo o plasmídeo pRT22 e os plasmídeos que codificam as variantes de NifA analisadas neste trabalho foram cultivadas em meio NFDM por cerca de 20 horas a 30°C e 250 rpm sob condições de anaerobiose. Os ensaios de ativação transcricional *in vivo* por variantes de NifA foram realizados na presença de amônio (7,56 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ou ausência de amônio (0,02% solução de caseína hidrolisada). *Av-NifA* corresponde à proteína NifA nativa de *A. vinelandii* expressa a partir do

plasmídeo pPR34, o qual contém o RBS de *nifL* de *A. vinelandii* (controle negativo). *Av-E356K-NifA* é uma variante de NifA de *A. vinelandii* não regulada por amônio que contém a mutação pontual E356K e é expressa a partir de pPR34 (controle positivo). *Ab-NifA* é a proteína NifA nativa de *A. brasilense*, enquanto *Ab-QL1-NifA* e *Ab-QL2-NifA* são variantes contendo deleção dos trechos 185-199 e 185-201 do Q-linker, respectivamente, todas expressas a partir do mesmo sistema. Os resultados para atividade de  $\beta$ -galactosidase foram expressos em unidades Miller. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata biológica.

Os resultados dos ensaios de ativação transcricional indicam que a proteína NifA de *A. brasilense* expressa isoladamente em *E. coli* ET8000 não é capaz de ativar a transcrição do gene de fusão *nifH::lacZ* nas condições testadas, mesmo em baixos níveis de amônio. É possível que os níveis de expressão de NifA a partir de pPR34 não sejam suficientes para causar ativação detectável da transcrição de *lacZ*, uma vez que esse plasmídeo possui substituição do RBS original pelo RBS de *nifL* de *A. vinelandii*, a fim de que quantidades mais brandas de NifA possam ser expressas e ativadas por GlnB disponível no citoplasma de *E. coli*.

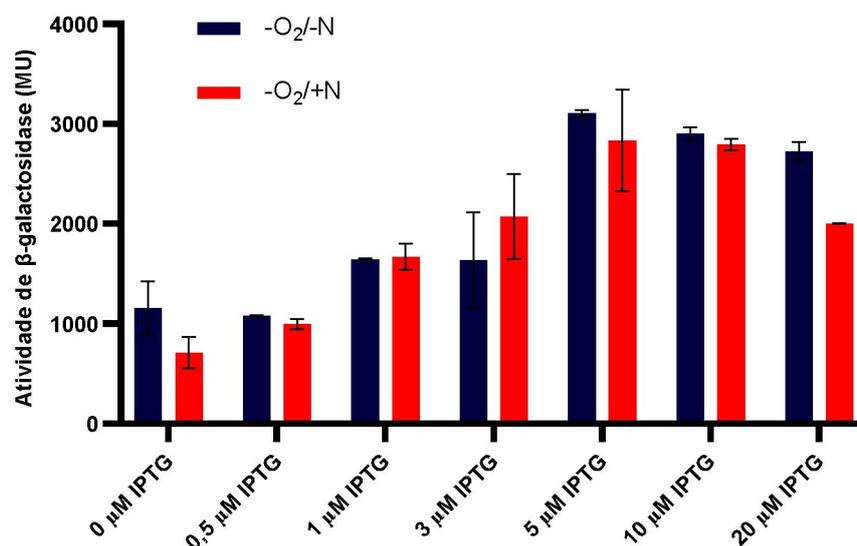
Experimentos realizados por Araújo e colaboradores (2004) mostraram que a proteína PII GlnB é essencial para atividade de *AbNifA* na estirpe YMC10 de *E. coli* em condições de baixo amônio e oxigênio, e que a proteína *AbNifA* é ativa quando *EcGlnB* é superexpressa. Esse resultado sugere que a falta de atividade de *AbNifA* em *E. coli* seria devido à baixa concentração de *EcGlnB* endógena. Resultado semelhante foi observado para a proteína NifA de *H. seropedicae*, cuja atividade em *E. coli* só é detectável quando há co-expressão de proteínas do tipo PII; nesse organismo também, variantes de NifA não reguladas frequentemente apresentam baixa atividade quando pouco expressas (STEFANELLO, 2018). Por esse motivo, os experimentos em ET8000 foram interrompidos e um outro sistema foi adotado para avaliar a atividade das variantes de NifA em *E. coli*. (seção 5.1.3).

### 5.1.3 Avaliação da ativação de uma fusão *nifH::lacZ* por variantes de NifA em *E. coli* JM109

Dada a ausência de atividade para o ensaio de ativação transcricional em *E. coli* ET8000, e baseado nos experimentos realizados por Nishikawa e colaboradores (2010) e Stefanello e colaboradores (2018), optou-se por avaliar a atividade das variantes de NifA em *E. coli* JM109 (DE3), estirpe que possui o gene que codifica a RNA polimerase do fago T7, necessária para alta expressão a partir de promotores T7. A expressão mais alta das variantes de NifA nesta linhagem permitiria detectar atividade de proteínas menos ativas que *AvNifA*. Para isso, as construções pTMA1701-pTMA1710 (seção 5.1.1; Figura 12) foram transformadas na estirpe JM109 (DE3) de *E. coli* carregando o plasmídeo repórter pRT22. Colônias transformantes foram cultivadas sob atmosfera anóxica em condições de alto nitrogênio (20 mM NH<sub>4</sub>Cl) ou baixo nitrogênio (0,02% de caseína hidrolisada) e usadas em ensaio de ativação transcricional,

conforme descrito na seção 4.11.4. Um experimento inicial foi realizado utilizando o plasmídeo pTMA11 (APOLONIO, 2018), o qual expressa a proteína NifA de *A. brasilense* truncada em seu domínio GAF a partir de um promotor induzível por IPTG. Diferentes concentrações de IPTG foram testadas, a fim de obter-se níveis otimizados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados são mostrados na Figura 14.

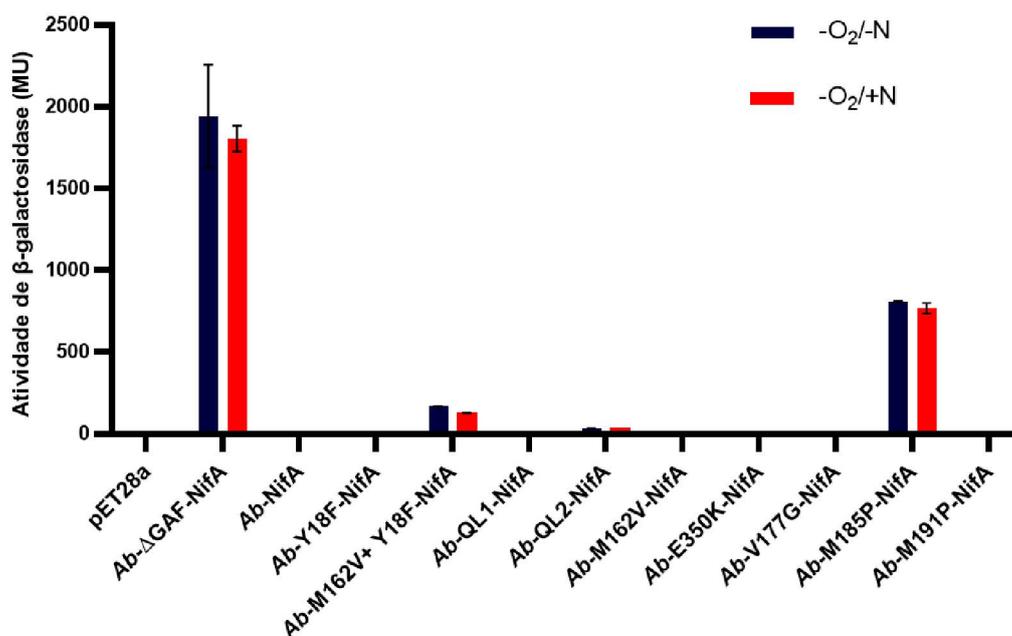
**Figura 14 - Atividade de  $\beta$ -galactosidase em culturas de *E. coli* JM109 expressando NifA N-truncada de *A. brasilense* sob indução com diferentes concentrações de IPTG**



Células de *E. coli* JM109 transformadas com os plasmídeos pRT22 (*nifH::lacZ*) e pTMA11 ( $\Delta$ GAF-*nifA*) foram cultivadas em meio NFDm por 6 horas a 30°C e 180 rpm sob condições de anaerobiose. Os ensaios de ativação transcricional *in vitro* foram realizados na presença de amônio (20 mM NH<sub>4</sub>Cl) ou ausência de amônio (0,02% solução de caseína hidrolisada). Diferentes concentrações de IPTG foram testadas, a fim de obter-se níveis otimizados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados foram expressos em unidades Miller e no gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata biológica.

O ensaio piloto mostrado na Figura 14 revelou um efeito dose-dependente de atividade de  $\beta$ -galactosidase à adição de IPTG até a concentração 5  $\mu$ M. A adição de concentrações superiores do indutor não levou a aumento da atividade enzimática detectada (em alto amônio,  $p > 0,05$  para as comparações 5  $\mu$ M x 10  $\mu$ M e 5  $\mu$ M x 20  $\mu$ M;  $p = 0,032$  para a comparação entre 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M em baixo amônio, sugerindo perda de atividade de NifA em 20  $\mu$ M de IPTG), indicando que os níveis ótimos de expressão haviam sido atingidos com doses inferiores. Desta forma, para os ensaios seguintes, células de *E. coli* JM109 (DE3) transformadas com as construções em pET28a expressando as variantes de NifA e carregando o vetor pRT22 foram cultivadas em meio NFDm com a suplementação de IPTG na concentração de 5  $\mu$ M (seção 4.11.4.1). Os resultados dos ensaios de atividade enzimática são mostrados na Figura 15.

**Figura 15 - Atividade de  $\beta$ -galactosidase em culturas de *E. coli* JM109 expressando variantes de NifA de *A. brasilense* sob indução com IPTG**



Células de *E. coli* JM109 foram cultivadas em meio NFDM suplementado com 5  $\mu$ M de IPTG por 6 horas a 30°C e 180 rpm sob condições de anaerobiose. Os ensaios de ativação transcricional *in vitro* foram realizados na presença de amônio (20 mM NH<sub>4</sub>Cl) ou ausência de amônio (0,02% solução de caseína hidrolisada). pET28a corresponde ao vetor vazio usado para as construções (controle negativo); Ab- $\Delta$ GAF-NifA é uma variante de NifA expressa a partir do vetor pET28a que não possui os primeiros 201 resíduos de aminoácidos que constituem o domínio GAF, e sua atividade não é inibida por íons amônio (controle positivo). Ab-NifA corresponde à proteína NifA nativa de *A. brasilense*, enquanto Ab-Y18F-NifA, Ab-M162V+Y18F-NifA, Ab-QL1-NifA, Ab-QL2-NifA, Ab-M162-NifA, Ab-E350K-NifA, Ab-V177G-NifA e Ab-M191P-NifA são variantes contendo mutação nas posições indicadas. Os resultados foram expressos em unidades Miller e no gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata biológica.

Os resultados dos ensaios de ativação transcricional do gene fusão *nifH::lacZ* em *E. coli* JM109 mostraram que a proteína NifA truncada em seus primeiros 201 resíduos de aminoácidos é ativa tanto na ausência quanto na presença amônio, confirmando dados obtidos anteriormente (NISHIKAWA, 2010; SOTOMAIOR *et al.*, 2012). Não foi observada ativação da transcrição do gene *lacZ* pela proteína NifA nativa na ausência de amônio, também em concordância com dados anteriores (ARAÚJO *et al.*, 2004); uma possível explicação para isto seria que a concentração mínima de PII necessária para induzir atividade detectável de AbNifA neste ensaio seja maior do que a concentração total de PII livre no citoplasma de *E. coli*. Como mostrado por Araújo e colaboradores (2004), a atividade de AbNifA só poderia ser detectada caso houvesse aumento da expressão de proteínas PII (por exemplo, através de co-expressão heteróloga de AbNifA e *EcGlnB*).

As variantes Ab-M162-NifA, Ab-E350K-NifA, Ab-V177G-NifA e Ab-M191P-NifA também mostraram-se incapazes de ativar a transcrição do gene de fusão *nifH::lacZ* nas duas condições testadas, constatada pela ausência de atividade da proteína  $\beta$ -galactosidase, como

mostra a Figura 15. Estes resultados sugerem inicialmente que essas variantes não têm atividade constitutiva (pelo menos não em *E. coli*), possivelmente porque necessitariam da proteína de transdução de sinal GlnB para estarem em seu estado ativo, diferentemente do que foi observado para a versão de NifA truncada em seu domínio GAF, cuja atividade mostrou-se independente da presença de GlnB. Outra explicação possível é que estas variantes sejam permanentemente inativadas devido a um efeito não previsto das mutações introduzidas.

Os ensaios de ativação transcricional mostraram ainda que a proteína *Ab*-M185P-NifA é ativa tanto na presença quanto na ausência de amônio, e que possivelmente sua atividade não requer o mesmo nível de expressão de GlnB que *Ab*NifA nativa exigiria. Há duas explicações possíveis para a atividade constitutiva de *Ab*NifA M185P em *E. coli*: ou esta variante possui maior afinidade por PII, de modo a poder ser ativada sob concentrações de PII menores do que as requeridas por *Ab*NifA; ou esta variante possui atividade independente da ativação por PII. A primeira hipótese parece ser a menos provável, visto que o resíduo M185 encontra-se no interdomínio QL, numa região predita como formando uma hélice de conexão entre os domínios GAF e AAA+, que não está implicada na detecção de sinal na única proteína semelhante com estrutura cristalográfica determinada (BATCHELOR *et al.*, 2013). Além disso, a substituição equivalente em NifA de *H. seropedicae* (Q184P) encontra-se no Q-linker, em uma região predita como pertencendo à interface do dímero de GAF, e não exposto na superfície, o que limitaria sua influência sobre a capacidade de interagir com PII a uma ação indireta sobre outros resíduos. Modelos construídos para *Ab*NifA também localizaram M185P na mesma região (ver seção 5.2.5 adiante).

A variante de NifA correspondente à combinação das substituições M162V e Y18F apresentou atividade detectável de ativação de *lacZ*, apesar de consideravelmente inferior quando comparada à versão N-truncada de *Ab*NifA ou à proteína *Ab*-NifA-M185P. Interessantemente, as proteínas *Ab*-M162V-NifA e *Ab*-Y18F-NifA não mostraram atividade em *E. coli* isoladamente. Uma possível explicação, entre muitas, é que a combinação dessas mutações altere o padrão de interação entre os resíduos M162 e Y18F e resulte em uma mudança de conformação que gere uma proteína levemente menos responsiva aos níveis de amônio. As proteínas *Ab*-QL1-NifA e *Ab*-QL2-NifA também mostraram-se incapazes de ativar o gene de fusão *nifH::lacZ* em estirpe JM109 de *E. coli* nas condições testadas, apesar de atividade residual ter sido detectado nesta última por comparação com o controle negativo ( $p < 0,01$  para as comparações em ausência ou presença de amônio).

## 5.2 Avaliação do efeito da mutagênese de NifA em *A. brasilense*

Uma vez que os ensaios de ativação transcricional em estirpes de *E. coli* não foram suficientemente conclusivos, e que ao menos uma das variantes geradas mostrou potencial de atividade não regulada por nitrogênio, NifA-M185P e as demais variantes de NifA foram expressas e testadas diretamente em *A. brasilense*. O estudo do efeito das mutações de forma direta no organismo parental poderia fornecer dados mais acurados sobre o fenótipo das variantes testadas, já que todos os componentes nativos envolvidos com a regulação da FBN estariam presentes e nas concentrações adequadas, possivelmente revelando algum grau de atividade das proteínas que foram pouco ativas em *E. coli*. Os ensaios em *A. brasilense* foram baseados em dados prévios de complementação da estirpe mutante de *nifA* FP10 (APOLONIO, 2018), em que foi possível restaurar o fenótipo de fixação de nitrogênio através da expressão de NifA a partir do plasmídeo pLAFR3.18 (MACHADO *et al.*, 1995). Este plasmídeo apresenta estabilidade de *A. brasilense* e, portanto, pode ser conjugado e utilizado em ensaios de caracterização de estirpes.

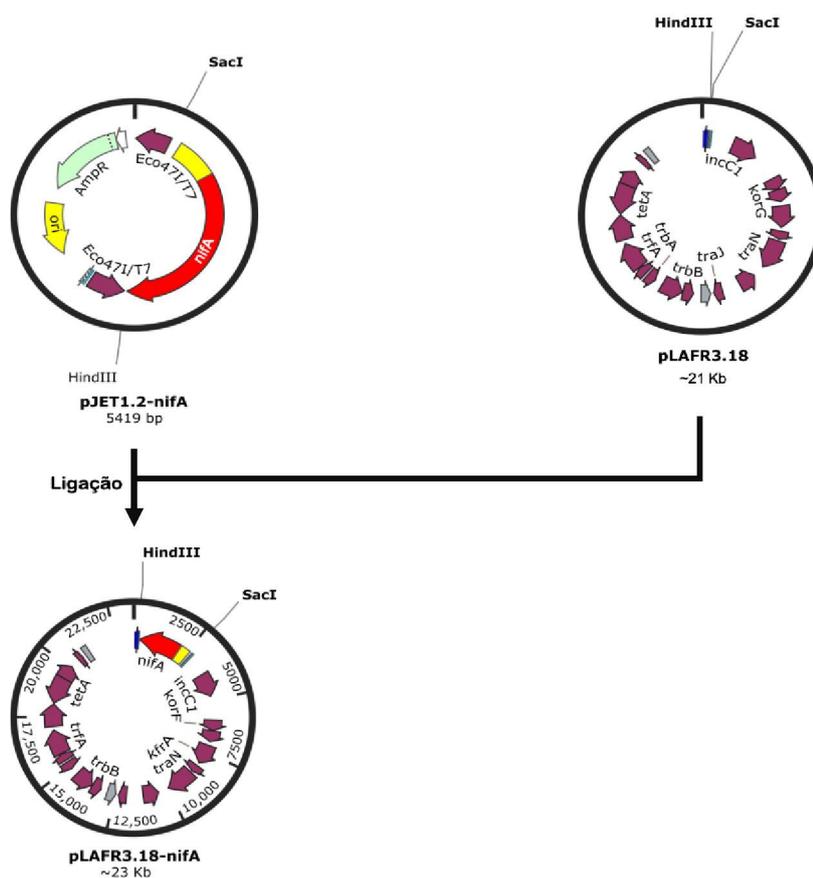
### 5.2.1 Construção de plasmídeos para expressão de variantes de NifA em *A. brasilense*

A transferência das mutações pontuais de *nifA* para o vetor de expressão em *A. brasilense* foi feita utilizando as construções em pJET1.2, descritas na seção 5.1.1 (Figura 10). Os plasmídeos pTMA1401-pTMA1406 foram digeridos com as enzimas *SacI* e *HindIII*, o que gerou os três fragmentos teóricos esperados: 2731 pb (vetor linearizado, fragmento *HindIII/SacI*) 2424 pb (inserto, fragmento *SacI/HindIII*) e 264 pb (vetor linearizado, fragmento *HindIII/HindIII*). A purificação do fragmento de inserto foi feita por meio da digestão adicional deste sistema com a enzima *ScaI*, que corta o fragmento maior do vetor linearizado, produzindo dois fragmentos menores (1851 pb e 880 pb) e facilmente distinguidos do fragmento de 2424 pb de inserto. Após a extração dos fragmentos do gel de agarose, estes foram purificados e ligados ao vetor pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos obtidos foram denominados pTMA1801, pTMA1802, pTMA1803, pTMA1804, pTMA1805 e pTMA1806, e expressam a proteína NifA nativa ou contendo as mutações M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, respectivamente, a partir do promotor *nifA* em pLAFR3.18 (Figura 16). A confirmação das construções foi feita por digestão com as enzimas *SacI* e *HindIII*, que gerou os fragmentos teóricos esperados de cerca de 21 kb e 2,4 kb, correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente; e por reação de sequenciamento, utilizando os *primers* M13-fwd e M13-rev.

Para a construção do vetor expressando NifA truncada entre os resíduos 185-201, o plasmídeo pTMA1705 (Seção 5.1.1; Figura 12), foi digerido com as enzimas *XbaI* e *HindIII*,

gerando os fragmentos teóricos esperados de 5207 pb e 1928 pb, referentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Depois de purificado do gel, o fragmento do inserto foi ligado ao vetor pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pTMA1904, que expressa a proteína *AbQL2-NifA* a partir do promotor *lac*. A confirmação da construção foi feita por meio da digestão com as mesmas enzimas, que produziu os fragmentos esperados de cerca de 21 kb e 1,9 kb, respectivamente.

**Figura 16 – Representação esquemática da construção de plasmídeos para expressão de variantes de *NifA* em *A. brasilense***



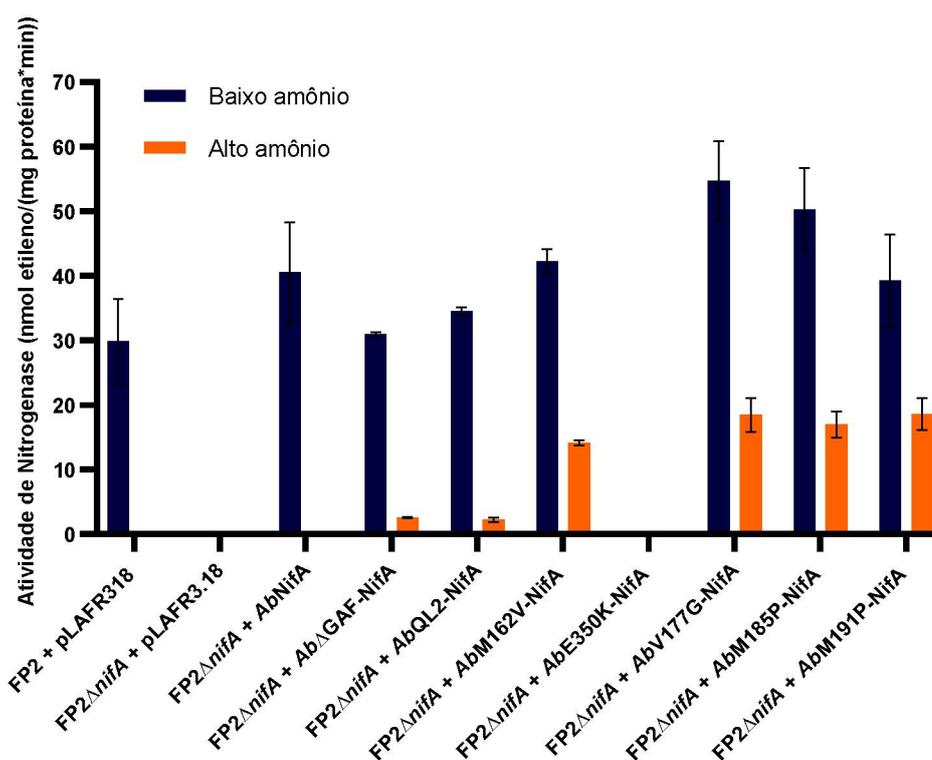
As construções em pJET1.2 contendo o gene *nifA* nativo ou com mutações pontuais em diferentes códons (mostrado em vermelho) foram digeridas com as enzimas de restrição *SacI* e *HindIII*. Os produtos obtidos foram purificados do gel e adicionados ao vetor pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos resultantes expressavam as variantes de *NifA* sob controle do promotor de *nifA* nativo e foram usados nos ensaios de complementação dos mutantes FP2 $\Delta$ *nifA*, 7628 e 2812. Os vetores pJET1.2-*nifA* e pLAFR3.18-*nifA* são representações dos plasmídeos pTMA1401-1406 e pTMA1801-1806, respectivamente (descrição na Tabela 2).

### 5.2.2 Complementação de estirpe mutante *nifA* de *A. brasilense*

Os plasmídeos pTMA12, pTMA1801-pTMA1806 e pTMA1904 foram transformados em estirpe S17.1 de *E. coli* e então transferidos para a estirpe FP2 $\Delta$ *nifA* de *A. brasilense* (ver item 5.2.4.1) utilizando o método de conjugação biparental, como descrito na seção 4.8. Essa

estirpe mutante foi utilizada por não expressar a proteína NifA e, portanto, não possibilitar a formação de heterohexâmetros indesejáveis com as proteínas expressas a partir de plasmídeo, o que poderia mascarar o real fenótipo das variantes testadas. Colônias transconjugantes capazes de crescer na presença do antibiótico tetraciclina foram utilizadas para os ensaios de determinação de atividade da nitrogenase (como detalhado na seção 4.11.1), os quais foram realizados em duas condições: baixo amônio (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Os resultados obtidos para atividade de nitrogenase são mostrados na Figura 17 abaixo.

**Figura 17 - Atividade de nitrogenase da estirpe mutante  $\text{FP2}\Delta\text{nifA}$  complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA**



A estirpe mutante  $\text{FP2}\Delta\text{nifA}$  de *A. brasilense* foi complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA a partir do próprio promotor *nifA* (exceto pTMA12 e pTMA1904). A estirpe selvagem FP2 foi adicionada ao ensaio como controle experimental, assim como a estirpe  $\text{FP2}\Delta\text{nifA}$  carregando o plasmídeo que expressa NifA nativa ou vetor pLAFR3.18 vazio. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (condição de alto amônio), pelo método de redução do acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). As atividades de nitrogenase foram expressas em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelo menos dois experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

Os ensaios de complementação mostraram que a proteína NifA nativa de *A. brasilense* expressa a partir de seu próprio promotor é capaz de restaurar a atividade de nitrogenase da estirpe mutante  $\text{FP2}\Delta\text{nifA}$  cultivada em baixos níveis de amônio, mostrando mesmo uma atividade mais elevada que a da atividade da estirpe selvagem ( $p=0,0102$ ). Por outro lado, a

complementação com o vetor pLAFR3.18 vazio não restaura a atividade da nitrogenase do mutante FP2 $\Delta$ nifA, como era esperado.

Dentre as variantes de NifA testadas, aquela correspondente à substituição E350K não foi capaz de restaurar o fenótipo de fixação de nitrogênio do mutante, mesmo em baixos níveis de amônio, o que sugere que o resíduo substituído seja importante para a estabilidade ou formação da conformação ativa da proteína em *A. brasilense*. Esse resultado é interessante, já que esse resíduo de glutamato é altamente conservado entre proteínas NifA de diferentes organismos (ver Figura 9), o que por si só sugere que este resíduo seja fundamental para a atividade da proteína. Contudo, os resultados obtidos para esta mutação em *Ab*NifA diferem do perfil observado recentemente para a substituição análoga E356K de *Azotobacter vinelandii*, cujo efeito gerou destruição da hierarquia de regulação dos genes *nif* devido à constante ativação de *Av*NifA, gerando mesmo excreção de amônio (BATISTA *et al.*, 2021). Essa diferença pode ser justificada pelo fato de que esses organismos apresentam diferentes mecanismos de regulação de NifA. Enquanto em *A. brasilense* a regulação da atividade de NifA ocorre diretamente pelos níveis de amônio e oxigênio, em *A. vinelandii* há a presença de uma outra proteína regulatória NifL, a qual forma um complexo inativo com NifA em resposta a altas concentrações de oxigênio ou íons amônio (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004).

Por outro lado, o experimento de determinação de atividade de nitrogenase também mostrou que a expressão das variantes M162V, V177G, M185P e M191P de NifA é capaz de restaurar a atividade da nitrogenase do mutante FP2 $\Delta$ nifA cultivado em baixos níveis de amônio, indicando que M162V, V177G, e M191P não são permanentemente inativas, o que era uma possibilidade a se considerar dados os experimentos em *E. coli*. As duas proteínas com maior atividade na ausência de amônio, V177G e M185P, revelaram até mesmo serem mais ativas na promoção da fixação de nitrogênio do que a proteína selvagem expressa nas mesmas condições ( $p=0,0012$  e  $0,0164$ , respectivamente). Mais interessante, os ensaios mostraram que essas proteínas também são pelo menos parcialmente constitutivas, visto que há atividade de nitrogenase mesmo na presença de alta concentração de amônio. Este resultado sugere que possivelmente essas variantes possuem alguma maneira de entrarem em sua conformação ativa independente da ativação por GlnB uridililada, visto esta proteína estar praticamente ausente no citoplasma de *A. brasilense* cultivado na presença de amônio. Isto tornaria o fenótipo destas proteínas condizente com os dados obtidos anteriormente para suas equivalentes em *Rhodospirillum rubrum* (ZOU *et al.*, 2008) e *Herbaspirillum seropedicae* (STEFANELLO, 2018), e diferente do que foi sugerido pelos dados prévios obtidos neste estudo a partir dos experimentos de ativação transcricional em *E. coli*, os quais mostravam que, dentre essas variantes, apenas a proteína M185P-NifA apresentaria atividade constitutiva sem

a necessidade de pré-ativação por GlnB (ver Figura 15). Alternativamente, uma vez que não foi avaliado o efeito direto de PII ou PII-UMP nas condições testadas, é possível que este fenótipo seja devido a um efeito direto da ligação de NifA a uma molécula efetora capaz de mantê-la sempre em sua forma desreprimida. Em estudo anterior foi mostrado que 2-OG é capaz de ligar-se ao domínio GAF de NifA de *A. vinelandii* e gerar uma mudança conformacional capaz de prevenir inibição por NifL sob condições de fixação de nitrogênio (LITTLE e DIXON, 2003). Em *A. brasilense*, porém, a ocorrência deste tipo de interação ainda não foi relatada.

A divergência entre as atividades de NifA M162V, V177G, e M191P mensuradas em *E. coli* e *A. brasilense* pode ser devido a uma combinação de diferenças de expressão, estabilidade, e regulação dessas proteínas. Em *E. coli*, 5  $\mu$ M de IPTG são o bastante para garantir expressão suficiente de  $\Delta$ GAF-NifA (ver Figura 14), mas talvez não sejam suficientes para expressar quantidade suficiente de NifA M162V, V177G ou M191P, caso estas proteínas sejam intrinsecamente menos ativas que  $\Delta$ GAF-NifA, ou mesmo simplesmente menos estáveis em *E. coli*. Neste caso, o uso de concentrações maiores do indutor IPTG acabaria por revelar a atividade dessas proteínas, compensando sua menor estabilidade e/ou atividade com maior expressão. Uma vez transferidas para *A. brasilense*, sob o controle do próprio promotor de *nifA*, o nível de expressão se tornaria alto o bastante para, neste *background*, gerar atividade detectável de NifA.

Além das variantes pontuais, duas outras variantes, *AbQL2-NifA* e *Ab $\Delta$ GAF-NifA*, (APOLONIO, 2018) contendo truncagem de trecho do Q-linker (185-201) e deleção completa do domínio GAF (201 resíduos iniciais de NifA), respectivamente, foram testadas. Ambas proteínas complementaram a atividade de nitrogenase do mutante FP2 $\Delta$ *nifA*, apesar da atividade detectada na presença de altos níveis de amônio ter sido claramente inferior em relação às variantes pontuais (ver Figura 17). É válido ressaltar que resultados similares foram obtidos por Apolonio (2018) em experimentos de complementação de mutantes de fenótipo Nif com plasmídeo expressando a proteína NifA truncada em seu domínio GAF.

Apesar de serem capazes de fixar nitrogênio constitutivamente, as estirpes descritas na Figura 17 mostraram-se incapazes de excretar amônio para o meio, sugerindo inalteração do controle das vias de assimilação de nitrogênio (dados não mostrados).

### 5.2.3 Complementação de mutantes PII de *A. brasilense*

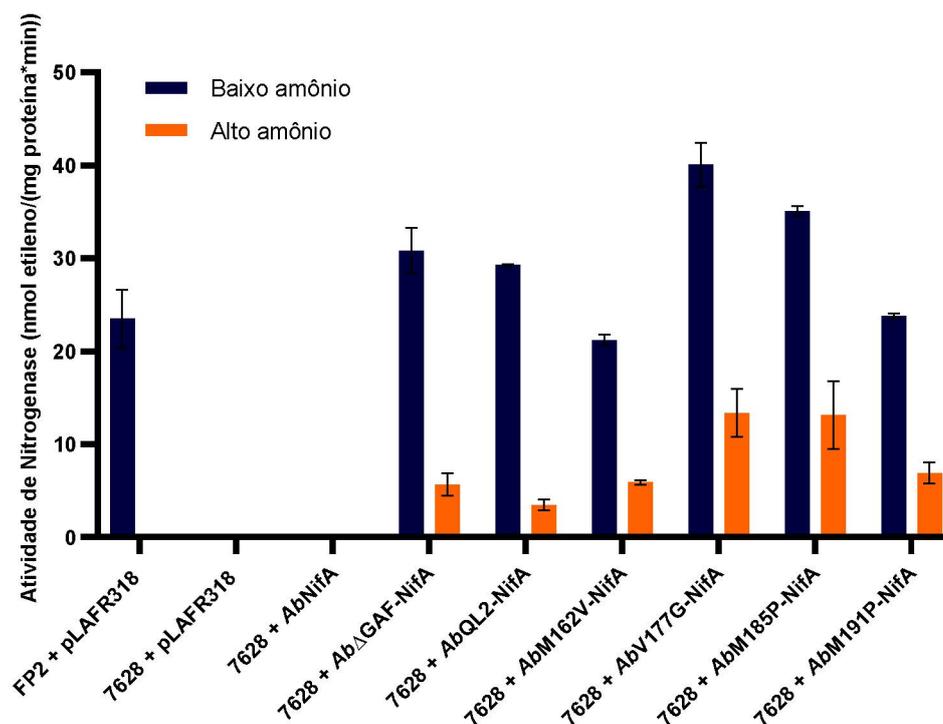
Os resultados descritos na seção 5.2.2 sugerem que as variantes de NifA obtidas neste estudo são, ao menos, parcialmente irresponsivas à disponibilidade de nitrogênio intracelular, uma vez que mostraram ser ativas mesmo na presença de altas concentrações de amônio. Com

o intuito de estudar a correlação desse fenótipo com a participação das proteínas de transdução de sinal PII na regulação da atividade dessas variantes de NifA, os plasmídeos pTMA12, pTMA1801-pTMA1806 e pTMA1904 (seção 5.2.2) foram transferidos para estirpes mutantes contendo deleção de *glnB* ou *glnB* e *glnZ* pelo método de conjugação biparental, como descrito na seção 4.8.

### 5.2.3.1 Complementação de estirpe mutante *glnB*

Inicialmente, as variantes foram avaliadas quanto à capacidade de restauração do fenótipo de fixação de nitrogênio pela estirpe mutante LFH3 (HUERGO *et al.*, 2006a), a qual possui deleção do gene *glnB* de *A. brasilense*. Com o intuito de eliminar possíveis interferências causadas pela expressão cromossomal de NifA, inicialmente foi feita a deleção completa de *nifA* utilizando o plasmídeo pTMA2003, de forma análoga à estratégia descrita mais adiante no item 5.2.4.1, originando o mutante LFH3 $\Delta$ *nifA*. Entretanto, efeitos deletérios de motilidade durante cultivo em meio semi-sólido dificultaram a medição de atividade da nitrogenase utilizando essa estirpe. Como alternativa, as construções expressando as diferentes variantes de NifA foram transferidas para o mutante 7628 (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996) de *A. brasilense* Sp7, o qual possui inserção de cassete de canamicina em sítio *Sall* central da CDS de *glnB*, interrompendo o gene no genoma. Entretanto, uma vez que essa estirpe é naturalmente resistente à canamicina, não foi possível realizar a deleção cromossomal de *nifA* utilizando o plasmídeo pTMA2003, devido à inviabilidade de seleção de mutantes simples. Por outro lado, uma vez que 7628 possui fenótipo Nif<sup>+</sup>, o religamento da nitrogenase pode ser tomado como medida direta da atividade das variantes de NifA expressas a partir de plasmídeo. Colônias transconjugantes resistentes ao antibiótico tetraciclina e capazes de crescer em meio semi-sólido foram utilizadas para os ensaios de determinação de atividade da nitrogenase, os quais foram realizados em duas condições: baixo amônio (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM de NH<sub>4</sub>Cl). Os resultados obtidos para atividade de nitrogenase são mostrados na Figura 18 abaixo.

**Figura 18 - Atividade de nitrogenase da estirpe mutante 7628 complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA**



A estirpe mutante 7628 de *A. brasilense* foi complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA a partir do promotor do próprio gene (exceto pTMA12 e pTMA1904). A estirpe selvagem FP2 foi adicionada ao ensaio como controle experimental, assim como a estirpe 7628 carregando o plasmídeo que expressa NifA nativa ou vetor pLAFR3.18 vazio. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (condição de alto amônio), pelo método de redução do acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelo menos dois experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

De acordo com os resultados, é possível observar que a estirpe carregando o plasmídeo pLAFR3.18 vazio ou expressando *AbNifA* não modificada não apresenta fixação de nitrogênio, conforme era esperado, já que a proteína nativa requer GlnB-UMP para sua ativação. Entretanto, todas as variantes testadas mostraram complementar a atividade de nitrogenase do mutante 7628, o qual torna-se capaz de fixar nitrogênio mesmo quando cultivado na presença de altos níveis de amônio. Além disso, é possível notar que, dentre as proteínas testadas, aquelas correspondentes às substituições V177G e M185P mostraram gerar níveis superiores de atividade de nitrogenase em relação às demais, especialmente na condição de alto amônio. Esses resultados sugerem que, além de serem menos responsivas ao controle por nitrogênio, essas proteínas são menos dependentes da ativação por GlnB, visto que suas atividades tanto na ausência quanto na presença de amônio foram pouco afetadas pela interrupção do gene *glnB*.

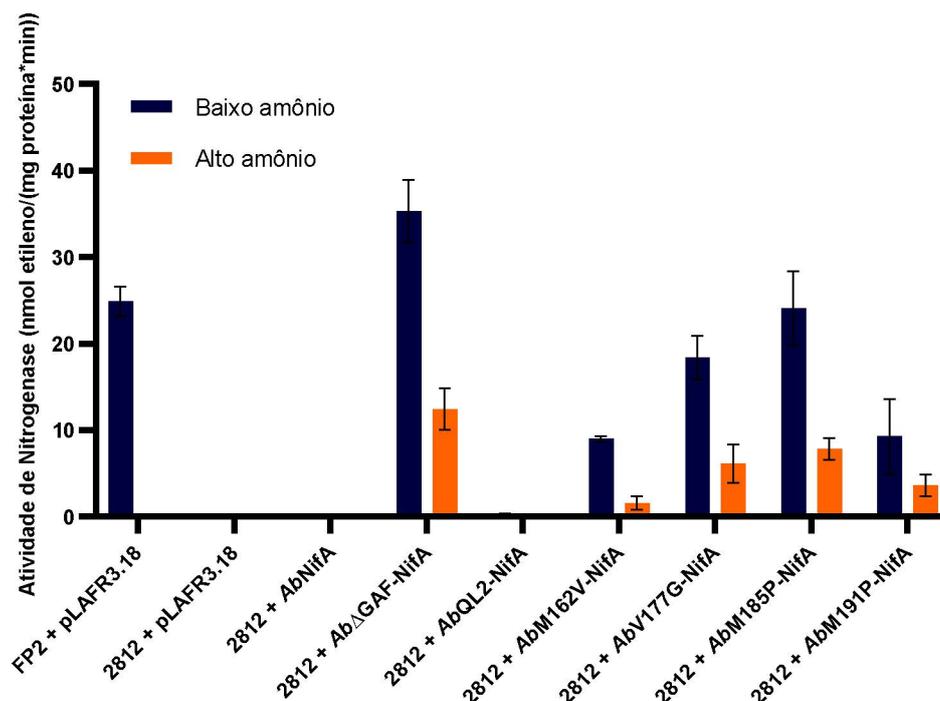
A comparação das atividades de nitrogenase promovidas por cada proteína em FP2 $\Delta$ nifA e Sp7 7628 revelou diminuição estatisticamente significativa da atividade promovida por *AbNifA* V177G e M185P, cerca de 20-25% na ausência de amônio ( $p < 0,001$ ), e 20-30% na presença de amônio ( $p < 0,05$ ). Uma vez que as perdas de atividade foram muito semelhantes na presença ou ausência de amônio, e que a variante selvagem de NifA é sensível ao estado de uridililação de GlnB (que responde ao nível intracelular de amônio), é pouco provável que o efeito observado seja um efeito direto da ausência de GlnB sobre as variantes de NifA. Além disso, possivelmente devido a pequenas diferenças ambientais durante a execução dos dois experimentos, até mesmo *A. brasilense* FP2 apresentou atividade reduzida da nitrogenase no ensaio mostrado na Figura 18 quando comparado ao ensaio mostrado na Figura 17 ( $p = 0,0328$ ); a relação entre as atividades de FP2 nos dois ensaios é de 0,786, não muito diferente da observada para *AbNifA* V177G (0,732 e 0,723 para 0,5 mM de glutamato e 10 mM de amônio, respectivamente) e *AbNifA* M185P (0,697 e 0,772).

Assim como observado para a estirpe FP2 $\Delta$ nifA complementada, os altos níveis de atividade da nitrogenase devido à expressão plasmidial das variantes de NifA não se traduzem em excreção de amônio (dados não mostrados), sugerindo acoplamento entre os processos de fixação e assimilação de nitrogênio.

### 5.2.3.2 Complementação de estirpe mutante dupla *glnBglnZ*

Com o intuito de verificar a atividade das variantes de NifA em um *background* contendo ausência de ambas as proteínas PII, as construções plasmidiais também foram transferidas para o mutante 2812 de *A. brasilense* Sp7 (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998), o qual não apresenta transcrição dos genes *glnB* e *glnZ*. Assim como observado para 7628, o mutante 2812 apresenta fenótipo Nif<sup>-</sup> e, portanto, a complementação da atividade de nitrogenase pode ser considerada como efeito direto da expressão das variantes de NifA. Colônias transconjugantes do mutante 2812 carregando as construções de interesse foram cultivadas em meio semi-sólido e submetidas ao ensaio de redução do acetileno em condição em limitação (0,5 mM de glutamato) ou suficiência de nitrogênio (10 mM de NH<sub>4</sub>Cl). Os resultados dos ensaios foram compilados e são apresentados na Figura 19 abaixo.

**Figura 19 - Atividade de nitrogenase da estirpe mutante 2812 complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA**



A estirpe mutante 2812 de *A. brasilense* foi complementada com plasmídeos expressando diferentes variantes de NifA a partir do promotor do próprio gene (exceto pTMA12 e pTMA1904). A estirpe selvagem FP2 foi adicionada ao ensaio como controle experimental, assim como a estirpe 2812 carregando o plasmídeo que expressa NifA nativa ou vetor pLAFR3.18 vazio. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio), pelo método de redução do acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). As atividades de nitrogenase foram expressas em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelo menos dois experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

Assim como observado anteriormente para o mutante *glnB*, a adição do plasmídeo pLAFR3.18 vazio ou expressando *AbNifA* nativa não complementa a atividade de nitrogenase do mutante duplo *glnBglnZ*, como era esperado. Dentre as variantes testadas, *AbΔGAF-NifA* mostrou ser a mais ativa em relação às demais proteínas em ambas as condições testadas, enquanto *AbQL2-NifA* mostrou-se inativa. Esse resultado é curioso, visto que essa última gerou atividade de nitrogenase quando expressa no mutante 7628, sugerindo que, na ausência de GlnB, possivelmente GlnZ possa participar na ativação da variante truncada no Q-Linker.

É válido ressaltar ainda que, apesar de as atividades específicas das variantes M162V, V177G, M185P e M191P terem sido inferiores em relação ao resultado mostrado na Figura 18 quando foram testadas em *background* contendo somente deleção de *glnB* ( $p < 0,004$  para as comparações em ausência ou presença de amônio), todas elas ainda assim mostraram-se ativas e pouco responsivas ao *status* de nitrogênio intracelular. Além disso, a expressão dessas duas últimas no mutante 2812 cultivado por cerca de 28 horas gerou excreção de cerca de 5-10 μM

de amônio, cuja detecção foi feita a partir do sobrenadante de culturas em meio semi-sólido pelo método do indofenol (seção 4.12) (dados não mostrados). Em conjunção, esses resultados permitem concluir que essas proteínas não necessitem de pré-ativação por PII para adotarem suas formas ativas e promoverem a transcrição dos genes *nif*. No entanto, é preciso notar que mesmo as variantes mais ativas (V177G e M185P) sofreram perda de atividade em relação à que mostraram no *background* contendo apenas a mutação de *glnB* (0,45 a 0,68), num contexto em que a estirpe selvagem e a estirpe expressando  $\Delta$ GAF NifA não apresentaram perdas. Isto poderia ser devido a algum efeito não predito de GlnZ sobre a atividade das variantes de NifA construídas ou sobre o promotor do gene *nifA* (neste experimento e nos anteriores, a proteína  $\Delta$ GAF-NifA está sendo expressa a partir do promotor *lac* de pLAFR3.18, ao passo que as demais variantes estão sendo expressas a partir do promotor *nifA*).

## 5.2.4 Construção de mutantes cromossomais de NifA de *A. brasilense*

### 5.2.4.1 Construção de estirpes contendo mutações pontuais ou deleção de parte da região de interdomínios QL de NifA

Tendo em vista que os experimentos de complementação de mutantes *nifA*, *glnB* e *glnBglnZ* permitiram a identificação de algumas variantes de NifA aparentemente menos reguladas em resposta à disponibilidade de nitrogênio e/ou PII, numa próxima etapa, as mutações foram transferidas para o genoma da estirpe FP2 de *A. brasilense*, a fim de verificar reprodutibilidade dos fenótipos obtidos nos experimentos com plasmídeos. A expressão cromossomal a partir do promotor *nifA*, com as variantes localizadas no próprio locus gênico de *nifA*, permitiria a avaliação do efeito das mutações introduzidas em NifA em um ambiente o mais próximo possível daquele do organismo selvagem (em contraste com a expressão a partir de pLAFR3.18, um derivado do plasmídeo RK2 que estima-se apresentar 5-8 cópias na célula - DITTA *et al.*, 1980).

Além das mutações descritas no item 5.2.2, foram também obtidos mutantes contendo as substituições Y18F e M162V combinadas. Para isso, inicialmente foi construída uma estirpe contendo deleção completa de *nifA* (mesma usada nos experimentos da seção 5.2.2), com o intuito de, numa próxima etapa, restituir o gene com as mutações desejadas. Essa estratégia foi adotada para facilitar a seleção de mutantes simples e duplos, já que a estirpe  $\Delta$ *nifA* apresentaria fenótipo Nif<sup>-</sup> e a cópia deletada do gene poderia ser facilmente identificada por reação de PCR.

Os produtos obtidos da amplificação das regiões localizadas à montante (UP) (-1080 – 71) e à jusante (DOWN) (1763 – 2947) de *nifA* com os primers Ab-*nifA*-del-UP\_fwd/ Ab-*nifA*-del-UP4\_rev e Ab-*nifA*-del-down3b\_fwd /Ab-*nifA*-del-DOWN\_rev, respectivamente, foram

ligados ao vetor pMBCRISPR-1 (Marcelo Bueno Batista, não publicado) linearizado no sítio *XbaI*, em uma reação única utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1), originando o plasmídeo pTMA2001. Este, por sua vez, foi usado como *template* para a amplificação do fragmento mutagênico UP-DOWN de *nifA* com os *primers* Ab-nifA-del-UP+Down\_fwd/Ab-nifA-del-UP+Down\_rev, sendo o produto (~2,3 Kb) adicionado ao vetor pMB18424 (Marcelo Bueno Batista, não publicado) linearizado no sítio *SmaI*, originando a construção pTMA2002. Este plasmídeo contém em sua sequência o cassete *sacB::Tc* (GAY *et al.*, 1983), que pode ser utilizado como marcador de seleção negativa para a identificação de mutantes que sofreram possíveis eventos de recombinação homóloga.

Numa etapa subsequente, o plasmídeo pTMA2002 foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*, e o produto de 2316 pb foi ligado ao vetor pK18mobsacB (SCHAFER *et al.*, 1994) digerido com as mesmas enzimas. O vetor resultante, denominado pTMA2003, foi confirmado por reação de digestão com as enzimas *BamHI* e *HindIII*, gerando os fragmentos teóricos esperados de 5689 pb (vetor linearizado) e 2304 pb (inserto), antes de ser transformado em *E. coli* S17.1. Um esquema das etapas de clonagem para obtenção dos plasmídeos mutagênicos é mostrado na Figura 20.



Regiões localizadas à montante (fragmento UP, mostrado em laranja) e à jusante (fragmento DOWN, mostrado em amarelo) do gene *nifA* foram amplificadas e ligadas ao plasmídeo pMBCRISPR-1 através da técnica de Gibson Assembly, originando o plasmídeo pTMA2001. O fragmento UP-DOWN de *nifA* mutagênico foi então transferido para o vetor pMB18424 por reação de PCR/Gibson Assembly, e em seguida, ao vetor pK18mobsacB por reação de digestão/ligação rápida, originando os plasmídeos pTMA2002 e pTMA2003, respectivamente. Os sítios de restrição usados nas etapas de clonagem são mostrados nos vetores. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas etapas de amplificação são mostrados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9.

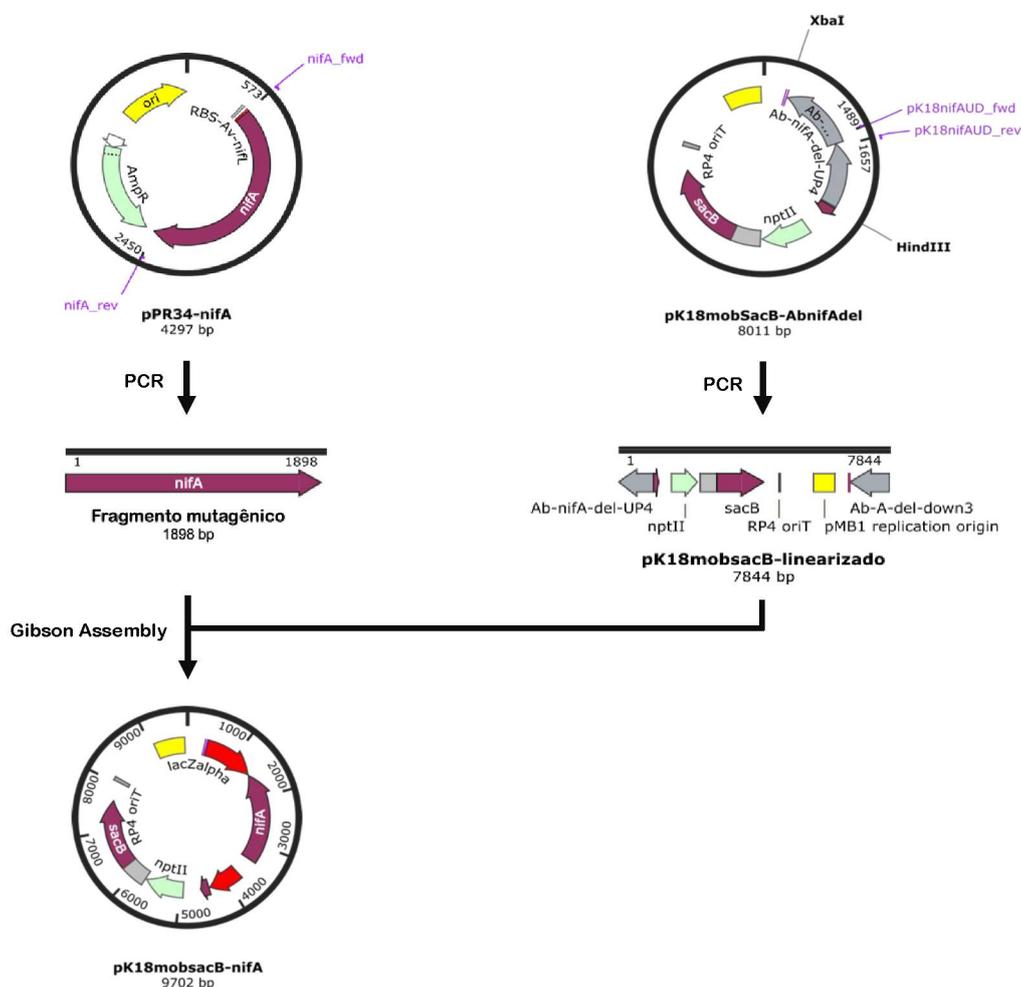
A transferência do plasmídeo mutagênico pTMA2003 para *A. brasilense* FP2 foi feita por conjugação biparental, conforme descrito na seção 4.8. Colônias transconjugantes resistentes ao antibiótico canamicina foram confirmadas quanto à ocorrência do primeiro evento de recombinação homóloga por reação de PCR utilizando os *primers* *nifA\_FOR\_2* e *nifA\_REV*, a fim de detectar as cópias selvagem (1944 pb) e deletada (253 pb) do gene. As etapas subsequentes de cultivo para obtenção de mutantes duplos foram feitas como descrito na seção 4.9.1.

Colônias oriundas da segunda etapa da construção de mutantes, capazes de crescer em meio contendo sacarose 10% e que apresentaram sensibilidade ao antibiótico canamicina, foram confirmadas quanto à deleção do gene *nifA*. Na primeira fase da confirmação, foram realizadas reações de PCR utilizando dois pares de *primers* diferentes: o primeiro contendo um *primer* 5' complementar ao início do promotor do gene (*nifA\_prom\_FOR*) e um *primer* 3' complementar a uma região interna do gene (*nifA\_V177G\_rev*), gerando um produto de 1081 pb (o qual não deve ser observado para colônias que apresentavam deleção do gene); e o segundo contendo um *primer* 5' complementar ao início da CDS de *nifA* (*nifA\_FOR\_2*) e um *primer* 3' complementar ao final da CDS do gene (*nifA\_REV*), gerando um produto de 1944 pb para colônias que reverteram ao genótipo selvagem ou 253 pb para colônias que apresentavam a cópia deletada do gene. Na segunda fase da confirmação de mutantes duplos, colônias que geraram o padrão de amplificação esperado foram analisadas por reação de sequenciamento utilizando o *primer* *nifA\_prom\_FOR*.

Após a confirmação da correta construção do mutante FP2 $\Delta$ *nifA*, foi feita a transferência das mutações pontuais e deleção da região de interdomínios QL de NifA para o genoma dessa estirpe, utilizando a mesma estratégia do vetor suicida (contendo cassete *sacBKm*). Para a construção dos plasmídeos mutagênicos, as construções pTMA1603 e pTMA1605-pTMA1610 (seção 5.1.1; Figuras 10 e 12) foram utilizadas como *templates* para reações de PCR utilizando os *primers* *nifA\_fwd* e *nifA\_rev*, a fim de amplificar os fragmentos clonados. Os produtos obtidos (~1,9 Kb) foram ligados ao plasmídeo pTMA2003 linearizado por reação de PCR (7844 pb) (*primers* pK18nifAUD\_fwd/pK18nifA-UD\_rev), utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). Os plasmídeos obtidos foram denominados pTMA2401, pTMA2402,

pTMA2403, pTMA2404, pTMA2405, pTMA2406 e pTMA2407, e continham o gene para expressão das proteínas Y18F+M162V, QL2, M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, respectivamente. Um esquema ilustrativo da estratégia empregada para construção dos plasmídeos mutagênicos é mostrado na Figura 21.

**Figura 21 - Construção de plasmídeos mutagênicos para a inserção de mutações pontuais de NifA no genoma de *A. brasilense***



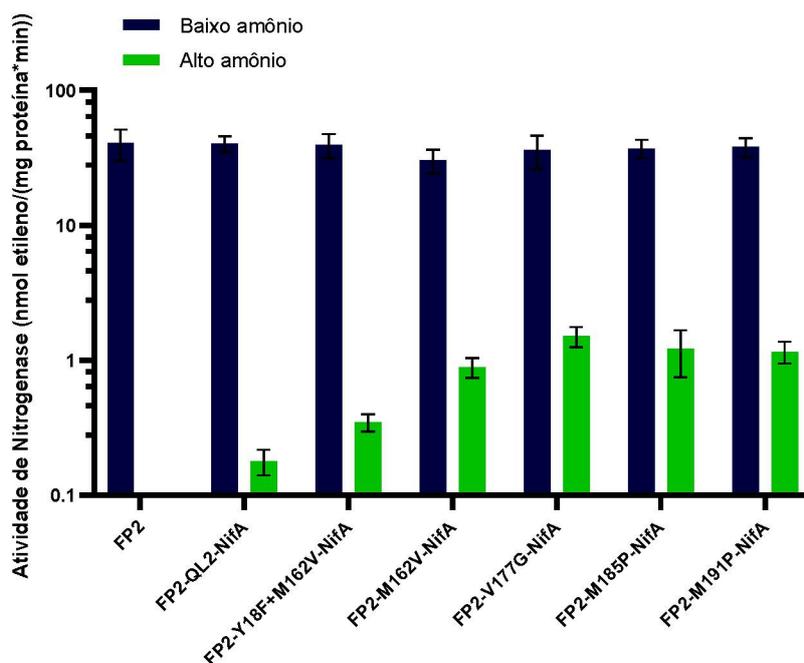
Construções em pPR34 contendo NifA truncada no Q-linker ou com mutações pontuais foram usadas como *templates* para reação de PCR, a fim de amplificar os fragmentos mutagênicos. Os produtos das reações de amplificação foram ligados ao vetor pK18mobsacB linearizado por PCR, utilizando a técnica de Gibson Assembly. Os vetores pPR34-nifA e pK18mobsacB-nifA são representações dos plasmídeos pTMA1603-1610 (exceto pTMA1604) e pTMA2401-2407, respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas etapas de amplificação são mostrados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9.

A confirmação dos plasmídeos foi feita por reação de restrição com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, buscando visualizar os fragmentos compatíveis esperados de cerca de 5,7 kb e 4 kb referentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Em seguida, os vetores foram transferidos para a estirpe FP2 $\Delta$ nifA por conjugação biparental (seção 4.9). Como mencionado anteriormente, a confirmação de mutantes simples foi feita pela detecção das cópias selvagem

(~1,9 kb) e deletada (~200 pb) do gene por meio de reação de PCR com os *primers* *nifA\_fwd* e *nifA\_rev*, e as etapas seguintes para obtenção de duplos foram feitas como descrito na seção 4.9.1. Colônias oriundas de placas contendo sacarose 10% e sensíveis ao antibiótico canamicina foram verificadas quanto à ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga. A primeira parte da confirmação foi feita através de reação de PCR utilizando dois pares de *primers* diferentes, de forma análoga à confirmação do mutante FP2 $\Delta$ *nifA* (ver tem 5.2.4.1). Contudo, o resultado observado para os mutantes pontuais ou deletados na região de interdomínios QL foi o inverso, isto é, as reações feitas utilizando um *primer* 5' complementar ao início da CDS de *nifA* (*nifA\_FOR\_2*) e um *primer* 3' complementar à região interna de *nifA* (*nifA\_E350K\_REV*) resultaram em produtos de amplificação (~1 kb), já que o gene foi restituído. Adicionalmente, os fragmentos resultantes da amplificação de *nifA* foram sequenciados para a confirmação da inserção das mutações desejadas com os *primers* *nifA\_fwd* e *nifA\_rev*. Os novos mutantes de *A. brasilense* foram denominados FP2-Y18F+M162V-NifA, FP2-QL2-NifA, FP2-M162V-NifA, FP2-E350K-NifA, FP2-V177G-NifA, FP2-M185P-NifA e FP2-M191P-NifA, e expressam NifA com as mutações Y18F+M162V, QL2, M162V, E350K, V177G, M185P e M191P, respectivamente, a partir do promotor de *nifA* no próprio locus gênico de *nifA*.

Após confirmação da identidade dos mutantes duplos, foi avaliada a capacidade dos mesmos de fixar nitrogênio através de ensaio de determinação de atividade da nitrogenase, conforme descrito na seção 4.11.1. Para isso, as estirpes foram cultivadas em meio NFbHP-lactato semi-sólido sob condições de baixo amônio (0,5 mM de glutamato) e alto níveis de amônio (10 mM NH<sub>4</sub>Cl). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 22.

**Figura 22 - Determinação de atividade da nitrogenase de estirpes mutantes contendo mutações pontuais de NifA**



Isolados das estirpes de *A. brasilense* contendo mutações no gene *nifA* inseridas no genoma foram submetidos ao ensaio de atividade de nitrogenase. A estirpe parental FP2 foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (condição de alto amônio) utilizando o método de redução de acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico, em escala log, estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelos menos dois experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

Os resultados dos ensaios de atividade de nitrogenase mostram que todas as mutações transferidas para o genoma geraram variantes de NifA ativas em condições de fixação de nitrogênio, e os valores obtidos para atividade específica de nitrogenase das estirpes mutantes foram comparáveis ao da estirpe selvagem FP2 ( $p > 0,06$  para todas as estirpes). Entretanto, as atividades detectadas em condições de não-fixação de nitrogênio foram muito baixas, inferiores às obtidas com a expressão heteróloga das mesmas variantes em  $\text{FP2}\Delta nifA$ , sugerindo regulação da atividade das variantes em resposta a altos níveis de amônio. É possível que o fenótipo observado seja um efeito da baixa expressão de NifA, já que transcrição do gene *nifA* em *A. brasilense* é parcialmente reprimida em resposta ao *status* de nitrogênio intracelular (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999).

Entretanto, visto que a principal diferença entre os mutantes cromossomais de *nifA* e o mutante  $\text{FP2}\Delta nifA$  complementado com os plasmídeos pTMA12, pTMA1801-pTMA1806 e pTMA1904, é a quantidade de cópias do gene *nifA* expresso (uma para os mutantes cromossomais, 5-8 para os plasmídeos), é possível que a diferença entre estes dois sistemas seja devida ao maior nível de expressão advindo do maior número de cópias. Note-se que, mesmo

na ausência de amônio, a atividade das variantes semi-constitutivas V177G e M185P foi mais baixa no sistema de expressão cromossomal do que no plasmidial ( $p < 0,008$ ). Por outro lado, uma redução de aproximadamente cinco vezes no número de cópias não parece o suficiente para explicar a redução de atividade de em torno de dez a vinte vezes observada ao comparar expressão plasmidial e cromossomal das variantes na presença de amônio.

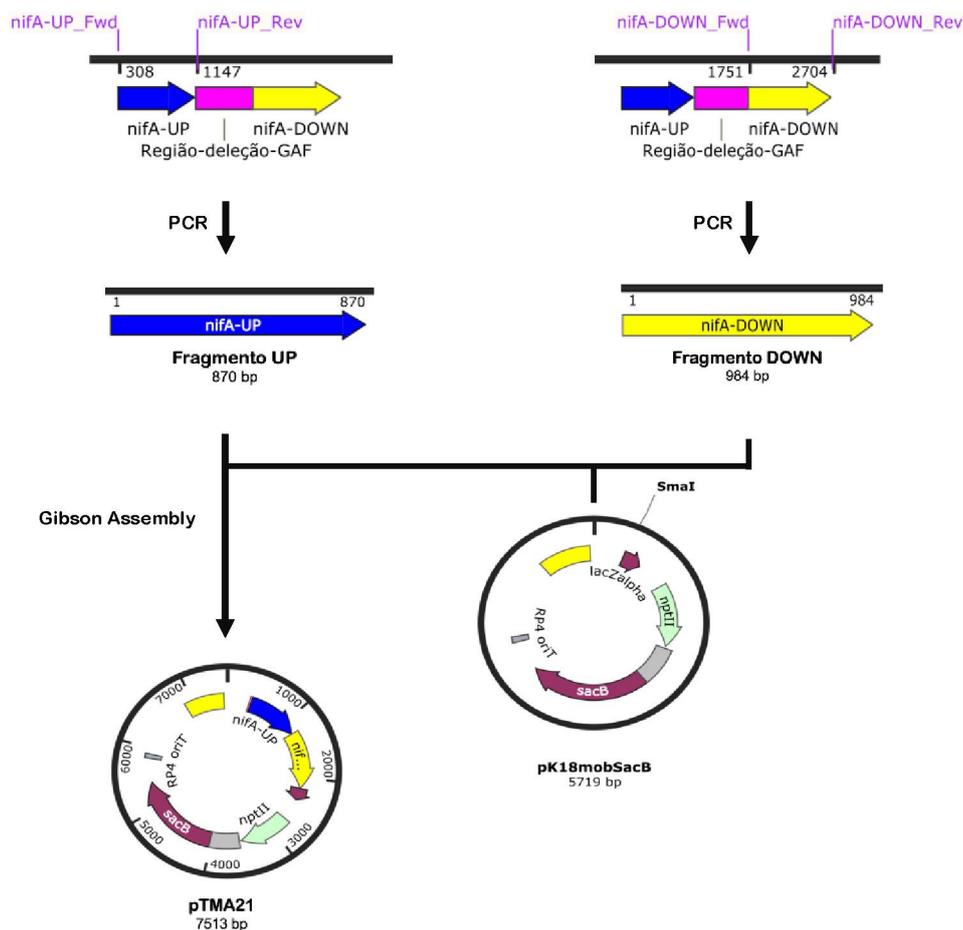
Esses resultados sugerem que outros pontos regulatórios da FBN precisam ser considerados. Um deles é o controle pós-traducional da nitrogenase, que possivelmente encontra-se inalterado nas estirpes mutantes. Neste contexto, é possível que o efeito observado nos experimentos de complementação de mutante *nifA* reflita um sobrecarregamento do sistema de regulação pós traducional da nitrogenase, motivado por excesso de NifA constitutiva que, por sua vez, leva à altos níveis de síntese de nitrogenase, acima da capacidade de controle por DraT. Esta hipótese foi testada nos experimentos relatados na seção 5.3.

#### 5.2.4.2 Construção de mutante contendo deleção do domínio GAF de NifA

Além da identificação de mutações pontuais ativadoras de NifA que gerem uma proteína constitutiva e independente de ativação por PII, uma outra estratégia de mutagênese deste estudo consistiu em deletar a região que codifica o domínio regulatório GAF de NifA no cromossomo de *A. brasilense*. A escolha do ponto de truncagem foi feita baseada em experimentos de ativação transcricional em *E. coli* realizados por Nishikawa e colaboradores (2010), nos quais foi demonstrado que a deleção dos 201 resíduos de aminoácidos iniciais da proteína resultava na perda do controle por amônio. Além disso, Apolonio (2018) mostrou que a expressão da mesma variante de NifA truncada no domínio GAF na estirpe FP10 (Nif<sup>-</sup>) a partir de plasmídeo foi capaz de religar a nitrogenase, sugerindo que a proteína é ativa.

A construção do plasmídeo mutagênico foi feita por meio da amplificação das regiões localizadas à montante (UP) (-837 – 3) e à jusante (DOWN) (607 – 1560) da região N-terminal de *nifA* alvo de deleção por reação de PCR utilizando os *primers* *nifA*-UP\_fwd/*nifA*-UP\_rev e *nifA* DOWN\_fwd/*nifA*-DOWN\_rev, respectivamente. Os fragmentos obtidos foram ligados ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI* em uma reação única, utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). O plasmídeo resultante, denominado pTMA21, foi confirmado por digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*, que geraram os fragmentos teóricos esperados de 5968 pb e 1815 pb, correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Além disso, as sequências clonadas foram analisadas por reação de sequenciamento utilizando os *primers* *nifA*-UP\_fwd e *nifA*-DOWN\_rev. Um esquema representativo das etapas de clonagem para a construção do plasmídeo mutagênico é mostrado na Figura 23.

**Figura 23 – Representação esquemática da construção de plasmídeo mutagênico para deleção da porção 5' de *nifA* no genoma de *A. brasilense***

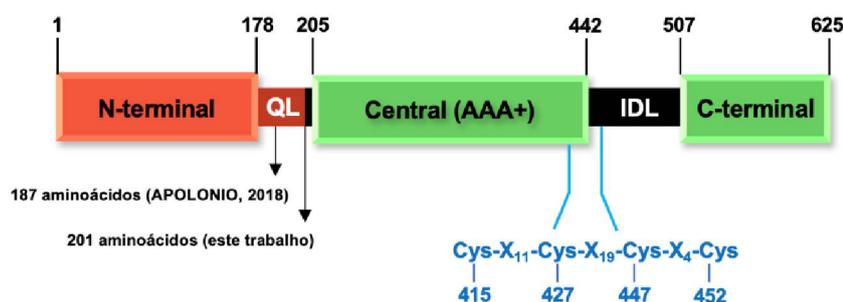


Regiões localizadas à montante (mostrado em azul) e à jusante (mostrado em amarelo) da porção 5' do gene *nifA* (mostrado em rosa) foram amplificadas e ligadas ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI*, através da técnica de Gibson Assembly. O plasmídeo mutagênico resultante, pTMA21, continha o fragmento UP-DOWN da região N-terminal de *nifA* e um cassete *sacB Km* para seleção de mutantes simples e duplos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas amplificações são mostrados em lilás e suas seqüências podem ser obtidas na Tabela 9.

Após as etapas de confirmação, o plasmídeo pTMA21 foi transformado em *E. coli* S17.1 e conjugado para *A. brasilense* FP2 pelo método de conjugação biparental (seção 4.8). Colônias transconjugantes resistentes ao antibiótico canamicina foram confirmadas quanto à ocorrência do primeiro evento de recombinação homóloga por reação de PCR utilizando um *primer* 5' (*nifA\_FOR\_2*) complementar ao início da CDS de *nifA* e um *primer* 3' (*nifA\_E356K\_REV*) complementar a uma região interna do gene, à jusante da porção N-terminal. O resultado das reações de amplificação revelou colônias contendo as cópias selvagem (1099 pb) e truncada (496 pb) do gene, as quais foram usadas nas próximas etapas para obtenção de mutantes duplos, como descrito na seção 4.9.1.

Colônias capazes de crescer na presença de sacarose e sensíveis à canamicina, foram testadas quanto à deleção da região 5' do gene *nifA*. A primeira etapa de confirmação foi feita por reação de PCR utilizando a mesma estratégia empregada para a identificação de mutantes simples, porém, visando a detecção somente da cópia truncada do gene (fragmento parcial de 496 pb). Em seguida, colônias confirmadas na primeira etapa foram analisadas por reação de sequenciamento utilizando os *primers* *nifA\_FOR\_2* e *nifA\_E356K\_REV*, visando a checagem da correta deleção *in frame* da região N-terminal de *nifA*. As sequências obtidas no sequenciamento foram usadas para um alinhamento local por meio do uso do algoritmo *blastx* do NCBI, cuja análise confirmou a correta identidade da estirpe mutante, que foi denominada FP2ΔGAF-*nifA*. Um modelo estrutural esquemático da região deletada de NifA é mostrado na Figura 24.

**Figura 24 - Modelo estrutural esquemático da porção deletada da proteína NifA de *A. brasilense***



Em vermelho estão destacados o domínio amino-terminal e a região de interdomínio QL que foram alvos de mutagenese nesse estudo. A deleção dessas regiões leva à construção de uma proteína NifA sem os primeiros 201 resíduos de aminoácidos. Na figura também é destacada a porção truncada de NifA em trabalho anterior (APOLONIO, 2018). Em verde estão destacados os outros dois domínios funcionais não modificados (central e carboxi-terminal). Em azul estão indicadas as regiões conservadas de cisteínas. Os números em preto indicam a posição dos aminoácidos na proteína NifA. Fonte: Adaptado (APOLONIO, 2018).

Após a confirmação da identidade da estirpe construída, esta foi cultivada em condições de baixo amônio (0,5 mM glutamato) e alto amônio (10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para determinação de atividade da nitrogenase utilizando o método de redução do acetileno, como descrito na seção 4.11.1. Os ensaios de atividade de nitrogenase mostraram que a deleção cromossomal dos 201 resíduos de aminoácidos iniciais da proteína NifA, que correspondem ao domínio N-terminal e a maior parte da região de interdomínios QL, gerou uma estirpe incapaz de fixar nitrogênio, mesmo em baixos níveis de amônio. Esse resultado coincide com dados obtidos anteriormente por Apolonio (2018) com uma deleção cromossomal de outro trecho do domínio GAF (Figura 24), sustentando a hipótese de que a truncagem do domínio N-terminal de NifA gera uma proteína de baixa estabilidade em *A. brasilense*. Com os dados que se tem até o momento não

é possível afirmar, entretanto, se a ausência de atividade de NifA é devido a uma falha na expressão da própria proteína, que pode estar sendo expressa em baixos níveis, ou se a mesma é degradada após ser traduzida por ser instável.

Um outro ponto a ser levantado é que essa diferença de fenótipo observada em relação à expressão plasmidial da mesma variante nos experimentos de ativação transcricional em *E. coli* (seção 5.1.3) e complementação de mutante em *A. brasilense* (seção 5.2.2; APOLONIO, 2018), pode ser efeito do número de cópias de plasmídeo, cuja expressão leva a maiores quantidades de proteína em comparação com a expressão cromossomal a partir do promotor do próprio gene nas estirpes mutantes, como discutido anteriormente.

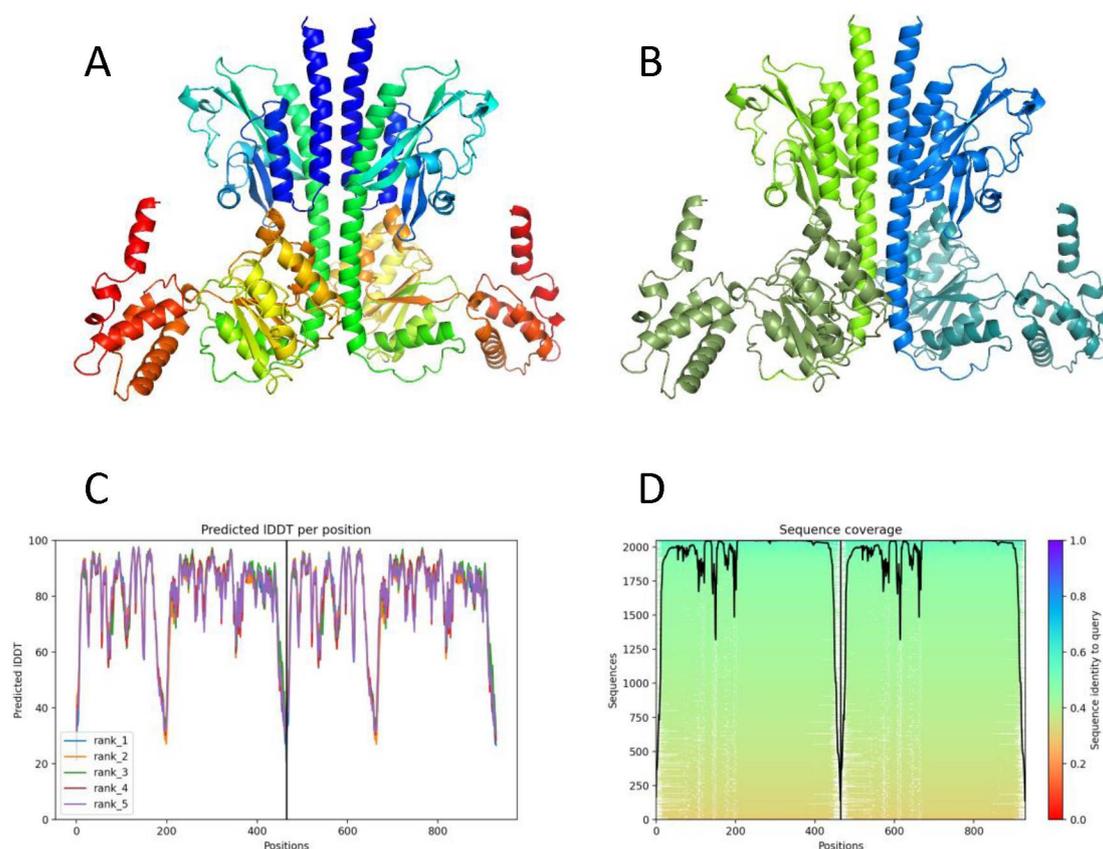
### 5.2.5 Modelagem estrutural de *AbNifA*

Com o intuito de buscar explicações para as diferenças de comportamento observadas entre *AbNifA* selvagem e os mutantes construídos, e valendo-se dos recentes avanços na área de modelagem estrutural de proteínas, foi feita a construção de uma série de modelos teóricos representando as estruturas da proteína NifA de *A. brasilense* contendo as mutações analisadas neste trabalho. As modelagens foram feitas através da ferramenta online ColabFold, conforme descrito na seção 4.4.4. O algoritmo AlphaFold2 mostrou-se capaz de modelar estruturas que possuam similaridades com templates conhecidos com uma precisão até então nunca atingida por outros programas (KRYSHTAFOVYCH *et al.*, 2021). A confiabilidade dos modelos gerados pelo algoritmo, sobretudo no caso de estruturas com pequenas divergências de sequência entre si, encontra-se ainda sob avaliação (YIN *et al.*, 2022; STEVENS e HE, 2022; FOWLER e WILLIAMSON, 2022). Resultados obtidos pela comunidade científica até o momento variam de extremamente encorajadores (CHAI *et al.*, 2021; TEJERO *et al.*, 2022) até moderadamente desanimadores (PAK *et al.*, 2002; SHIONE e YOSHIDOME, 2022), sugerindo que, embora superior aos softwares utilizados anteriormente, os modelos gerados com AlphaFold devem ser analisados com cautela.

As estruturas de *AbNifA* foram modeladas sempre como um dímero usando os resíduos 1-465 da proteína. A escolha de um modelo dimérico foi feita devido à observação de que a proteína mais semelhante a *AbNifA* a ter sido cristalizada foi em estado dimérico de seus domínios GAF (BATCHELOR *et al.*, 2013), e de que uma proteína quimérica contendo os primeiros 409 resíduos de NifA de *H. seropedicae* existe em estado dimérico em solução (STEFANELLO, 2018). A exclusão dos últimos 160 resíduos foi feita em razão das limitações do programa AlphaFold-multimer implementado no ColabFold, que só permite a modelagem de sequências com comprimento total de <1000 resíduos de aminoácidos, número excedido pelo dímero completo de *AbNifA*.

A Figura 25 mostra o melhor modelo criado para um dímero da região 1-465 de *AbNifA*. 25A e 25B mostram a representação da estrutura secundária e terciária previstas, com o esquema de cores representando a progressão da sequência primária e a delimitação da região regulatória N-terminal (1-203) e da região catalítica em ambos os monômeros. De grande interesse para este trabalho são as duas  $\alpha$ -hélices (resíduos 1-27 e 153-195) que se prevê formarem a interface entre os dois monômeros de *AbNifA*, região proposta como importante para a regulação de EBPs (BATCHELOR *et al.*, 2013) e onde se localizam todas as mutações avaliadas aqui.

**Figura 25 - Modelo estrutural dos resíduos 1-465 de *AbNifA***



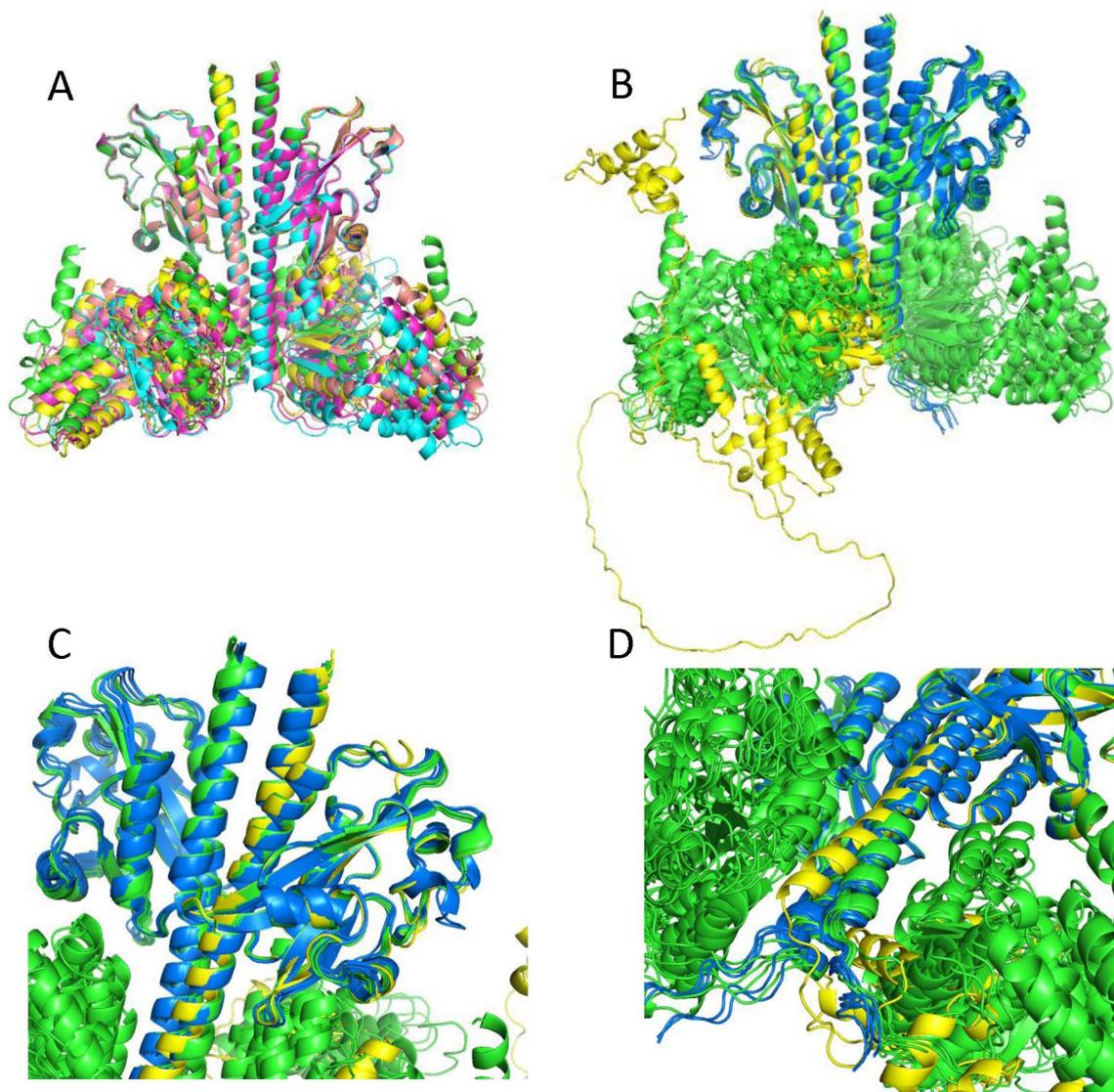
O modelo estrutural mostrado é o que apresentou o melhor *score* entre os cinco gerados automaticamente pelo programa AlphaFold-Multimer. (A) Dímero de *AbNifA*, com a coloração das fitas representando a progressão da estrutura primária do N-terminal (azul) ao central (vermelho); (B) Dímero de *AbNifA*, com a coloração das fitas representando os dois monômeros (verde *versus* azul) e os dois domínios modelados (GAF *versus* AAA+, cores saturadas *versus* cores pouco saturadas); (C) Medidas de confiança geradas para cada posição modelada; o número de posições total é 930 (soma dos dois monômeros); (D) Cobertura da sequência 1-465 de *AbNifA* no alinhamento múltiplo gerado para a construção do modelo.

As medidas de qualidade do modelo gerado indicam boa cobertura da sequência de 1-465 de *AbNifA* (25D), com exceção dos primeiros resíduos do domínio GAF e dos últimos resíduos do interdomínio ID na porção C-terminal do modelo. Regiões de menor identidade do que a média ocorrem no final do domínio GAF, especialmente nas regiões que foram modeladas

como constituindo o começo e o final da grande  $\alpha$ -hélice de conexão entre os dois domínios de cada monômero.

Os 5 modelos gerados para o dímero de 1-465 *AbNifA* foram comparados entre si por alinhamento de seus domínios GAF, a fim de entender quais foram as possibilidades de estrutura consideradas durante a construção da estrutura. A Figura 26A deixa claro que os 5 modelos concordam bastante com relação à estrutura dos domínios GAF e a seu posicionamento em relação ao outro domínio GAF no dímero, mas discordam bastante quanto ao seu posicionamento relativo aos domínios AAA+. Esta divergência poderia ser um artefato da técnica, visto que a região de conexão entre os domínios GAF e AAA+ apresenta menos similaridade do que a média com as proteínas usadas para gerar o alinhamento (Figura 25D); no entanto, é uma predição coerente com o mecanismo esperado para a ativação de AAA+ proposto para Nlh1 de *Aquifex aeolicus* (BATCHELOR *et al.*, 2013) e sugerido por dados experimentais de Stefanello (2018) para NifA de *H. seropedicae*. Segundo o modelo, os domínios GAF permaneceriam sempre na forma dimérica, e a diferença entre o estado ativo e o inativo de NifA estaria em o quanto de liberdade os domínios AAA+ teriam para se moverem e formarem o hexâmetro cataliticamente ativo.

**Figura 26 - Comparação entre modelos gerados para 1-203, 1-465 e 1-625 de *AbNifA***



(A) Sobreposição dos 5 modelos gerados para 1-465 de *AbNifA*, alinhados no domínio GAF da cadeia b. Cada cor representa o dímero gerado por um modelo diferente; (B) Sobreposição dos 5 modelos gerados para 1-465 de *AbNifA* (verde) aos cinco modelos gerados para 1-203 de *AbNifA* (azul) e ao modelo disponível online para 1-625 de *AbNifA* (amarelo), alinhados no domínio GAF da cadeia b; (C) Detalhe da sobreposição mostrada em B, destacando a diferença estrutural predita para os modelos de 1-203 NifA na face do GAF exposta ao solvente; (D) Detalhe da sobreposição mostrada em B, destacando a diferença na posição predita para o final do Q-linker.

Os modelos de 1-465 de *AbNifA* também foram comparados com 5 modelos gerados a partir dos resíduos 1-203 e *AbNifA* (contendo somente o domínio GAF) e ao modelo de *AbNifA* completa disponível na AlphaFold Database (VARADI *et al.*, 2021). Desta vez, algumas diferenças se mostraram presentes (Figura 26B, C e D); todos os modelos de 1-203 de *AbNifA* encontraram uma pequena região de  $\alpha$ -hélice na face do GAF exposta ao solvente (Figura 26C), que não foi prevista para os modelos de 1-465 e 1-625 NifA. Esta diferença, a princípio, poderia ser artefato da técnica; as modelagens de seções mais longas da proteína acabam por excluir alguns possíveis *templates* para o GAF dos alinhamentos realizados para prever estrutura,

possivelmente causando perda de alguns detalhes. No entanto, apesar disto, nota-se boa concordância quanto ao restante da estrutura do GAF nos 11 modelos. A segunda discordância é mais interessante devido a ser coerente com mais de um modelo proposto para a regulação da atividade das EBPs: a adição de tanto o estado dimérico quanto a presença dos domínios AAA+ tem o efeito de tensionar o Q-linker, afastando-o da superfície de interação entre os domínios GAF. A existência de uma certa tensão na  $\alpha$ -hélice interdomínios é compatível com o modelo proposto por Batchelor e colaboradores (2013), mas a aproximação entre as superfícies dos domínios GAF e AAA+ é remanescente dos modelos propostos para NorR (BUSH *et al.* 2010) e, anteriormente, NifA de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999).

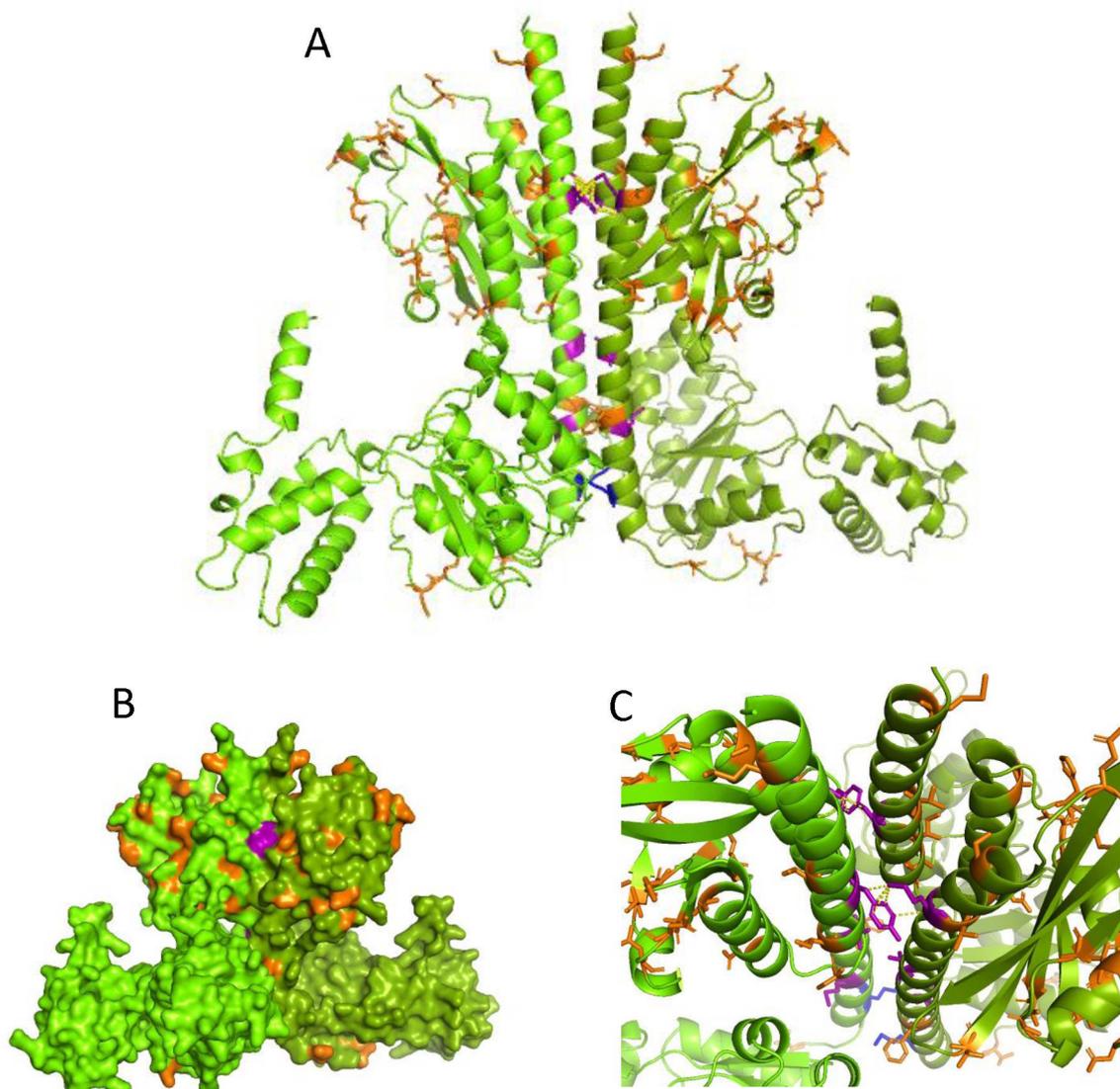
Os modelos de *AbNifA* tendo sido satisfatórios, pareceu interessante introduzir no modelo as mutações Y18F, Y18F+M162V, M162V, V177G, M185P, M191P e  $\Delta(185-203)$ , todas as quais afetam as duas hélices que formam a interface entre os monômeros de GAF e observar as diferenças estruturais propostas. Com o intuito de diferenciar entre divergências na estrutura preditas especificamente por causa da presença da substituição de interesse e aquelas causadas por vieses do programa, decidiu-se também fazer uma série de modelos de *AbNifA* contendo mutações controle – substituições em locais próximos aos das mutações efetivadas, mas que se espera que não tenham efeito sobre a estrutura e atividade da proteína.

Para a seleção das mutações controle, foi feito um alinhamento de proteínas com alta similaridade com *AbNifA* encontradas em *Azospirillum* e *Roseomonas*; o raciocínio foi de que, para proteínas NifA parecidas (mas não idênticas) com *AbNifA* e encontradas em organismos filogeneticamente próximos, a estrutura e mecanismo de regulação poderiam ser parecidas com os observados em *A. brasilense* e, portanto, quaisquer diferenças pontuais encontradas entre elas têm grande chance de não terem efeito estrutural. Estas sequências foram obtidas do banco de dados nr do NCBI após realização de tblastn usando sequência de *AbNifA* como *query*. O alinhamento gerado pelo algoritmo tblastn foi então aberto no programa MEGAX e analisado manualmente. Buscou-se encontrar diferenças pontuais de sequência que cumprissem os seguintes critérios: 1) Resíduo presente nas posições 1-203; 2) Diferença com *AbNifA* encontrada em ao menos um dos organismos; e 3) Diferença presente num contexto em que os 3 resíduos de aminoácidos imediatamente anteriores e imediatamente posteriores fossem idênticos aos presentes em *AbNifA*. Esta abordagem permitiu a identificação de 33 resíduos que poderiam conter mutações neutras, localizados ao longo de todo o domínio GAF (Figura 27, em laranja). O alinhamento realizado está mostrado no material suplementar da tese (S1).

Note-se que, em contraste com as mutações presumidamente neutras, as mutações ativadoras estudadas neste trabalho estão todas muito pouco expostas ao solvente (Figura 27B), indicando que seu mecanismo de ação dificilmente envolveria um aumento direto na afinidade

por PII, por exemplo, embora efeitos indiretos não possam ser descartados a priori. De especial interesse é o resíduo M191, cuja mutação M191P gerou atividade constitutiva de NifA em *A. brasilense* (seção 5.2.2); este resíduo não é particularmente conservado, e diversos organismos próximos possuem valina em vez de metionina nesta posição, o que torna a modelagem de *AbM191V*-NifA especialmente interessante para comparar com a de *AbM191P*-NifA.

**Figura 27 - Localização das mutações neutras e ativadoras no modelo de *AbNifA***

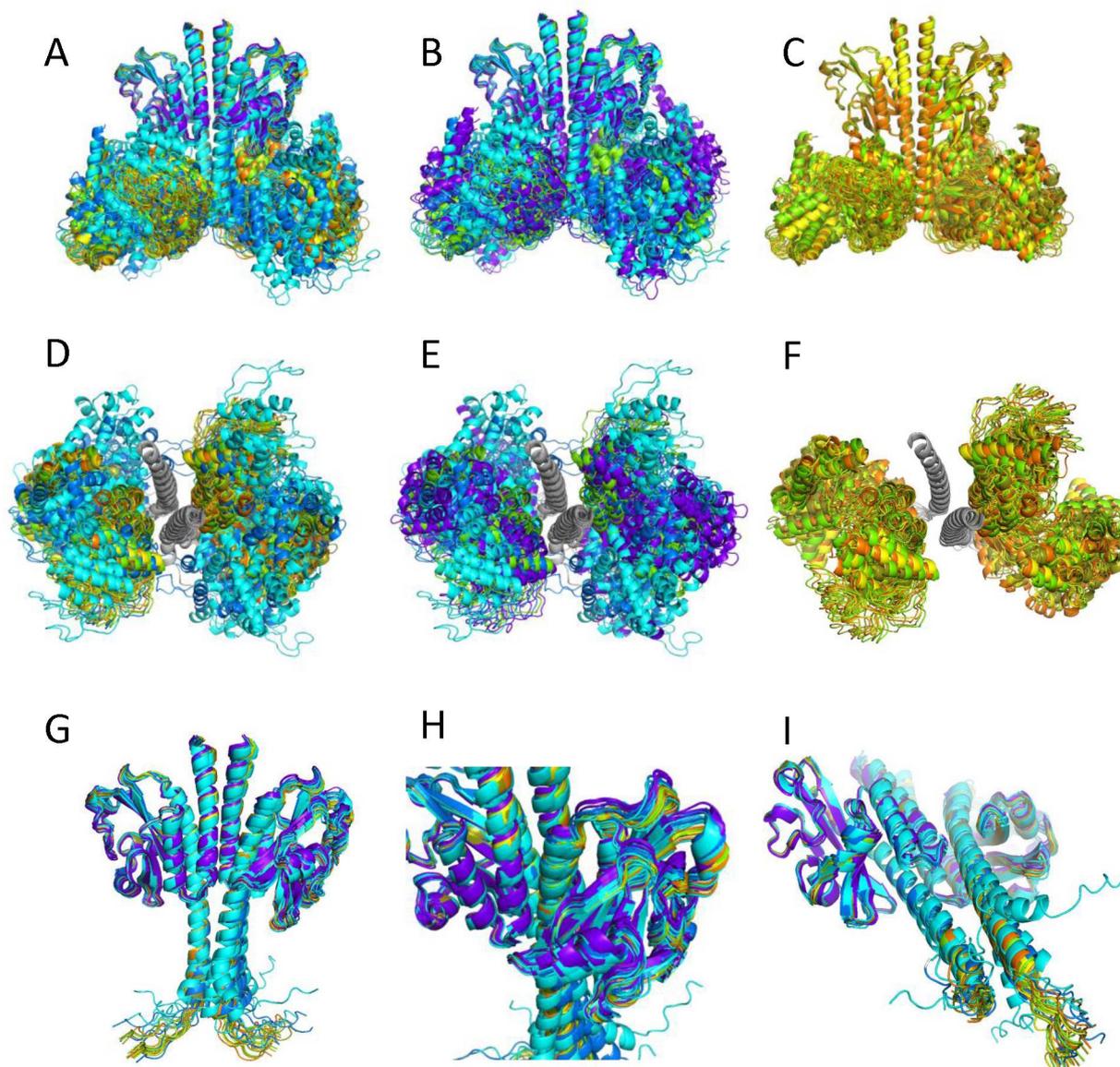


O modelo de *AbNifA* usado para a visualização é o mesmo mostrado na Figura 25. (A) Representação de estrutura secundária de *AbNifA*, destacando os resíduos identificados como possíveis alvos de substituições neutras (laranja), bem como alvos de mutagênese ativadora (roxo; todas são mutações avaliadas neste trabalho), e, em azul, o resíduo M191, que além de se ter verificado possuir uma substituição ativadora (M191P), também foi identificado como possível alvo de uma substituição neutra; (B) Representação de superfície do mesmo modelo mostrado em A, destacando a pouca exposição ao solvente das mutações ativadoras (roxo) comparado com algumas das mutações presumidamente neutras (laranja); (C) Detalhe da interface entre os monômeros de GAF, mostrando as interações preditas entre os resíduos Y18 e M162 (3,5 angstroms).

A localização dos resíduos no modelo de *AbNifA* também permite observar que há uma interação predita entre os resíduos Y18F e M162V de *AbNifA*. Os contatos preditos não envolvem a hidroxila do resíduo de tirosina, implicando em que sua substituição para fenilalanina não deveria impactá-los; o mesmo não pode ser dito para a substituição M162V, visto que a interação com Y18 envolve a metila distal da metionina.

Levando em conta o que foi discutido acima, selecionou as substituições T16A (controle para Y18F), Y183F (controle para M185P) e M191V (controle para M191P) para serem modeladas no dímero de *AbNifA* em paralelo com a modelagem das mutações ativadoras respectivas. Não foram encontradas substituições neutras possíveis próximas a V177. Um último controle adicionado foi a mutação D118E, localizada no GAF a grande distância da interface de interação do dímero, servindo de controle para eventuais inconstâncias do programa no posicionamento relativo dos domínios GAF e AAA+. A Figura 28 mostra a sobreposição dos conjuntos de 5 modelos gerados para os resíduos 1-465 de *AbNifA*, *AbV177G-NifA*, *AbM185P-NifA*, *AbM191P-NifA*, e os controles *AbY183F-NifA*, *AbM191V-NifA*, e *AbD118E-NifA*.

**Figura 28 - Comparação de modelos estruturais de *AbNifA* contendo diferentes substituições**



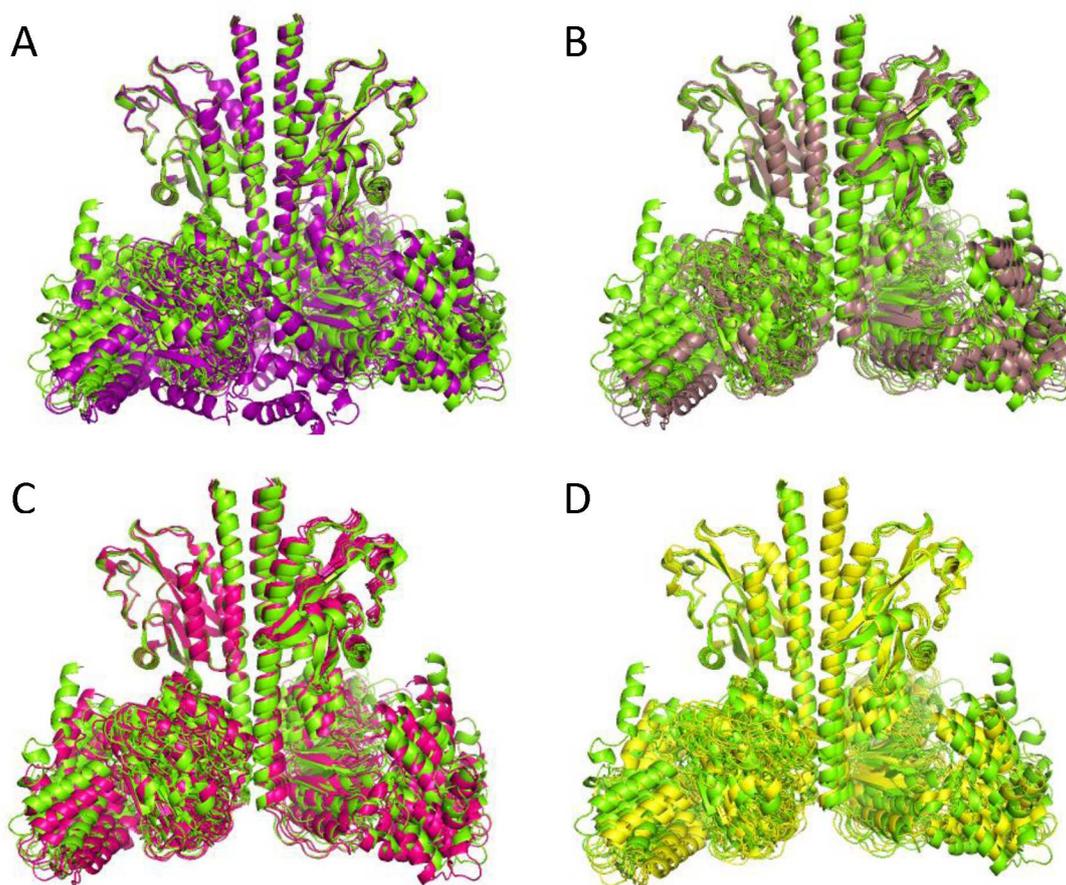
Sobreposição das estruturas de 1-465 *AbNifA* selvagem (verde) e contendo as substituições V177G (azul), M185P (ciano), M191P (roxo), D118E (amarelo), Y183F (laranja), e M191V (oliva). (A) Sobreposição de todos os 35 modelos, mostrando a maior dispersão nas posições do domínio AAA+ nas proteínas contendo as mutações ativadoras se comparadas à selvagem e às proteínas contendo substituições neutras; (B) Sobreposição dos modelos de *AbNifA* selvagem e *AbNifA* contendo substituições ativadoras; (C) Sobreposição dos modelos de *AbNifA* selvagem e *AbNifA* contendo substituições neutras; (D) Sobreposição de todos os 35 modelos; vista superior após remoção da visualização dos resíduos 1-155 e coloração em cinza dos resíduos 156-203; (E) O mesmo que em D, mas mostrando somente *AbNifA* selvagem e com as substituições ativadoras; (F) O mesmo que em D, mas mostrando somente *AbNifA* selvagem e com as substituições neutras; (G) Sobreposição de todos os 35 modelos, mostrando somente os resíduos 1-203; (H) Detalhe de G, mostrando a região mais distal do domínio GAF da cadeia A, que não foi usado para fazer a sobreposição no programa PyMol; (I) Sobreposição de todos os 35 modelos, mostrando somente os resíduos 1-203, focando nos resíduos terminais do Q-linker.

A Figura 28 mostra que os modelos gerados para todas as substituições concordam bem quanto à estrutura do domínio GAF (28A e G), com a principal diferença observada sendo

quanto ao posicionamento relativo dos dois GAF do dímero; as substituições ativadoras geraram uma ligeira aproximação entre os domínios GAF (28H; em tons de azul). Grandes divergências são vistas, porém, no posicionamento dos domínios AAA+ e na estrutura terciária do Q-linker. Embora mesmo os modelos gerados para as substituições neutras tenham apresentado diferenças quanto ao posicionamento relativo de AAA+ em relação ao GAF quando comparadas com a proteína selvagem (28C e F), é nítido que a dispersão é maior nos modelos que contêm as mutações ativadoras (28B e E). A razão para esta dispersão maior é explicável pelas diferenças observada na estrutura do Q-linker nos modelos que contêm as substituições ativadoras: em V177G e ainda mais em M185P, o Q-linker encontra-se ainda menos reto do que na proteína selvagem; e no mutante M191P, os 5 resíduos finais que formam a hélice conectora (191-195) perdem sua estrutura secundária helical, permitindo maior liberdade de movimento para os domínios AAA+.

As substituições Y18F, Y18F+M162V e M162V também foram modeladas no dímero de 1-465 de *AbNifA*, paralelamente com a modelagem da mutação controle T16A. A sobreposição dos modelos obtidos é mostrada na Figura 29.

**Figura 29 - Comparação de modelos estruturais de *AbNifA* contendo diferentes substituições (2)**



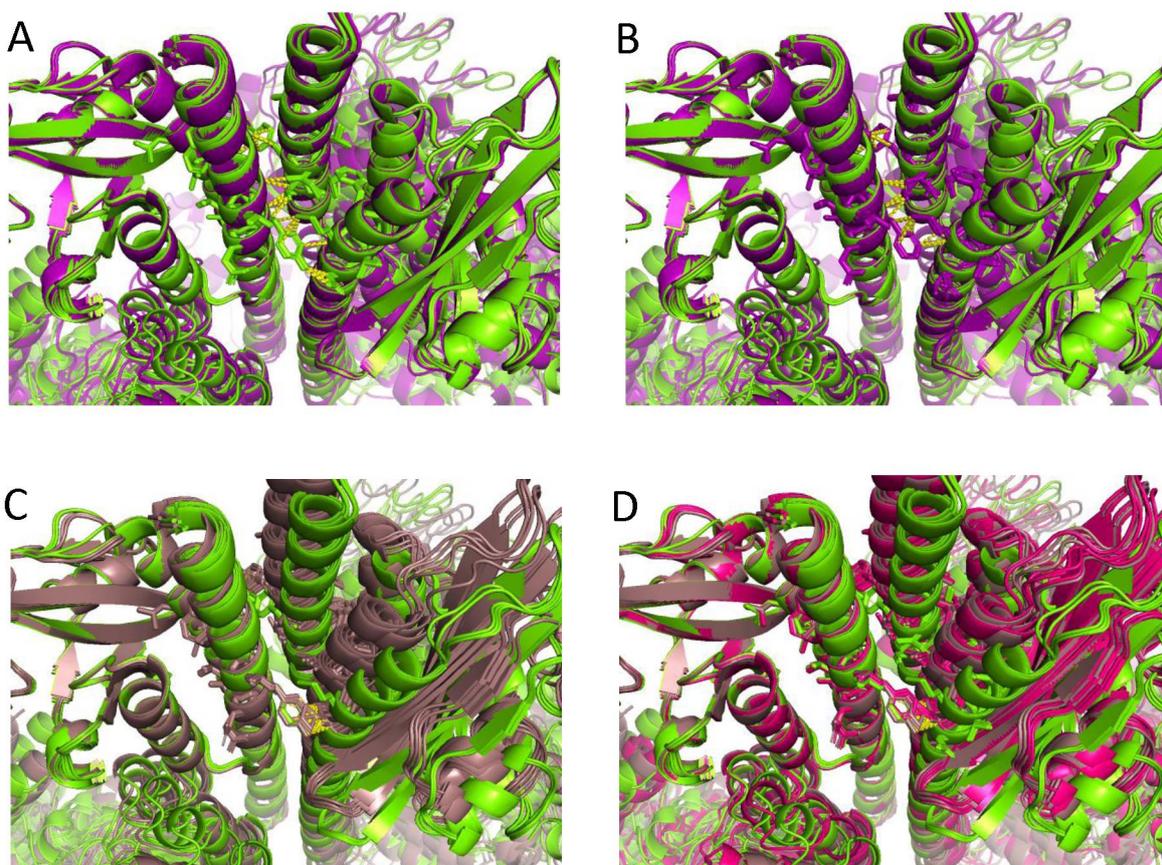
**Sobreposição das estruturas de 1-465 *AbNifA* selvagem (verde) e contendo as substituições: (A) Y18F (roxo); (B) M162V (marrom); (C) Y18F+M162V (fuchsia); (D) T16A (amarelo).**

No caso desse conjunto de mutações, é possível perceber uma alteração no posicionamento dos domínios AAA+ na presença da mutação simples Y18F; mas essa alteração não é tão visível quanto as observadas na Figura 28, nem tão diferente das alterações previstas para a mutação controle T16A. Mais interessante, a mutação M162V não mostra grandes diferenças no posicionamento dos AAA+, e a dupla mutação Y18F+M162V tem estrutura semelhante à modelada para M162V. Mesmo assim, estes dois últimos mutantes possuem atividade na presença de amônio em *A. brasilense* (avaliados neste trabalho), indicando que sua atividade deve ser explicada por outro mecanismo que não o mau posicionamento constitutivo do AAA+ (que foi usado para explicar as mutações mostradas na Figura 28).

Uma possível explicação pode ser extraída dos modelos estruturais ao se comparar as interações previstas para a interface entre os domínios GAF (Figura 30). De acordo com os modelos, a perda da hidroxila do resíduo Y18 leva à perda de interação entre Y18 e N165 (30A e B), possivelmente enfraquecendo localmente a interação entre os domínios GAF e permitindo

maior movimentação da estrutura à jusante – possivelmente, movimentações esporádicas que não são estáveis o bastante para serem capturadas em um modelo que usa dados de cristalografia como banco de dados. O efeito de M162V é ainda mais drástico: embora toda a estrutura secundária do GAF permaneça inalterada, há uma clara diferença no posicionamento relativo dos GAFs do dímero, ocasionada pela perda de interação com o resíduo 18. Mais grave ainda, a mudança de posição implica na perda de todas as interações entre as cadeias laterais dos resíduos 15-21 aos resíduos 159-165, exceto pela interação entre Y18 e N165 (30C). O duplo mutante Y18F+M162V apresenta perda até mesmo desta última interação (30D). É possível que, neste mutante, a explicação proposta para o funcionamento de Y18F seja ainda mais plausível.

**Figura 30** – Comparação de modelos estruturais de *AbNifA* contendo diferentes substituições (3)



Detalhe da interface entre os domínios GAF dos dímeros de *AbNifA* modelados, contrastando o posicionamento de resíduos entre a proteína selvagem (verde) e as contendo substituições ativadoras (em outras cores). Em todos os modelos, foram mostradas as cadeias laterais dos resíduos 15-21 e 159-165 e também as interações entre eles a uma distância de até 3,5 angstroms. (A) *AbY18F-NifA*, mostrando os contatos entre resíduos de *AbNifA* selvagem; (B) *AbY18F-NifA*, mostrando os contatos entre resíduos de *AbY18F-NifA*; (C) *AbM162V-NifA*; (D) *AbM162V-NifA* (marrom) e *AbY18F+M162V-NifA* (fuchsia).

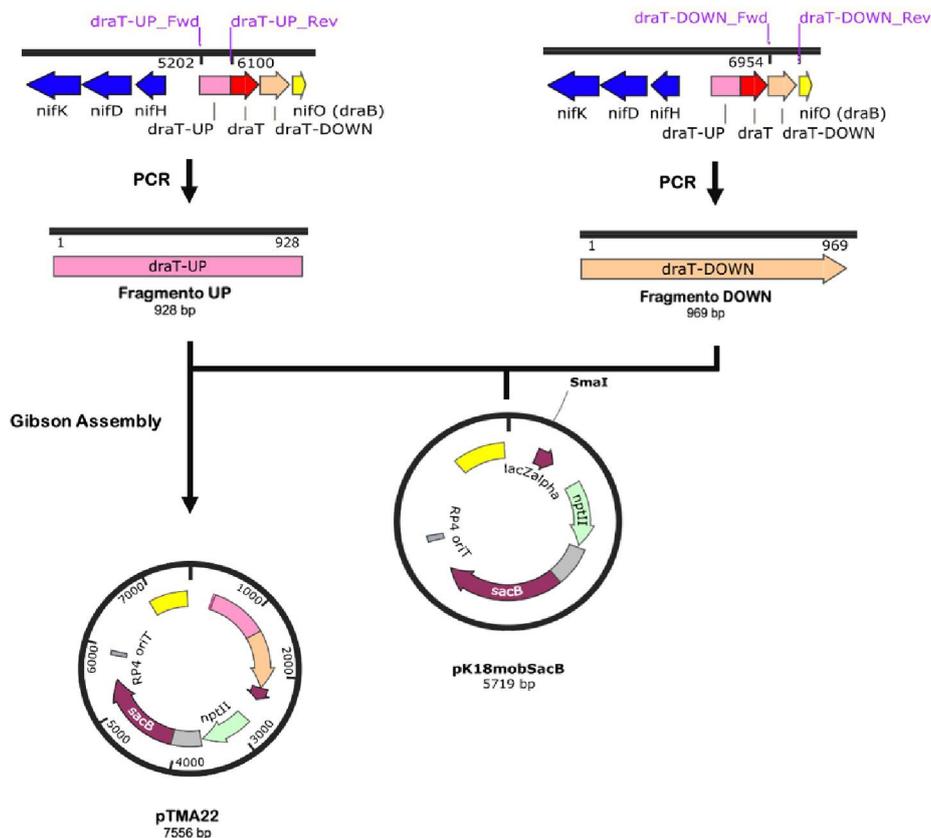
### 5.3 Avaliação do efeito da deleção de *draT* em *A. brasilense*

Além do regulador central da transcrição dos genes *nif* (NifA), esse trabalho também visou explorar o efeito da mutagênese do gene *draT* que codifica para a enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase, responsável por inativar a proteína ferro sob altos níveis de amônio. Partindo-se do pressuposto de que as estirpes mutantes pontuais de *nifA* construídas (seção 5.2.4.1) ainda possuíam regulação a nível pós-traducional da nitrogenase, e que esta etapa de regulação poderia ser parcialmente responsável pela atividade de nitrogenase dos mutantes em presença de amônio ser tão menor do que a registrada na ausência de amônio, a deleção do gene *draT* poderia ser decisiva no sentido de desreprimir NifH e possibilitar a obtenção de estirpes mutantes mais eficientes na fixação de nitrogênio em condições de suficiência de nitrogênio.

#### 5.3.1 Construção de plasmídeo mutagênico para deleção de *draT* no genoma de *A. brasilense*

A estratégia empregada para a construção do mutante *draT* foi baseada no uso de vetor suicida, como descrito para obtenção dos mutantes cromossomais de *nifA* na seção 5.2.4. Os produtos da amplificação das regiões localizadas à montante (UP) (-838 – 90) e à jusante (DOWN) (871 – 1809) de *draT*, utilizando os *primers* draT-UP\_Fwd/draT-UP\_Rev e draT-DOWN\_Fwd/draT-DOWN\_Rev, respectivamente, foram ligados ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI* em uma única reação utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). O plasmídeo resultante, denominado pTMA22, foi confirmado por reação de digestão com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, as quais geraram os fragmentos teóricos compatíveis com os tamanhos esperados de 5698 pb, 1066 pb e 792 pb. Adicionalmente, o vetor foi submetido à reação de sequenciamento utilizando o *primer* draT-UP\_Fwd, com o intuito de confirmar a ausência de mutações indesejadas. Um esquema representativo das etapas de clonagem para obtenção do plasmídeo mutagênico é mostrado na Figura 31.

**Figura 31 – Representação esquemática da construção de plasmídeo mutagênico para deleção de *draT* no genoma de *A. brasilense***



Regiões localizadas à montante (mostrado em rosa) e à jusante (mostrado em laranja) do gene *draT* foram amplificadas e ligadas ao plasmídeo pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI*, através da técnica de Gibson Assembly. O plasmídeo mutagênico resultante, pTMA22, continha o fragmento UP-DOWN do gene *draT* e um cassete *sacBkm* para seleção de mutantes simples e duplos de *A. brasilense*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas ampliações são mostrados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9.

### 5.3.2 Construção de mutantes contendo deleção do gene *draT* no genoma

Após as etapas de confirmação, o plasmídeo pTMA22 foi transformado em *E. coli* S17.1 e então transferido para as estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ *nifA* por conjugação biparental (seção 4.8). Colônias transconjugantes resistentes ao antibiótico canamicina foram confirmadas quanto ao primeiro evento de recombinação homóloga por reação de PCR utilizando os *primers* draT-UP\_Fwd e draT-DOWN\_Rev, a fim de detectar as cópias selvagem (1363 pb) e deletada (508 pb) do gene. As etapas subsequentes para obtenção de mutantes duplos foram feitas como descrito na seção 4.9.1. A confirmação de colônias contendo deleção do gene *draT* foi feita tanto por reação de PCR, utilizando os mesmos *primers* supramencionados e visando detectar somente da cópia deletada (508 pb), quanto por sequenciamento, também utilizando os mesmos

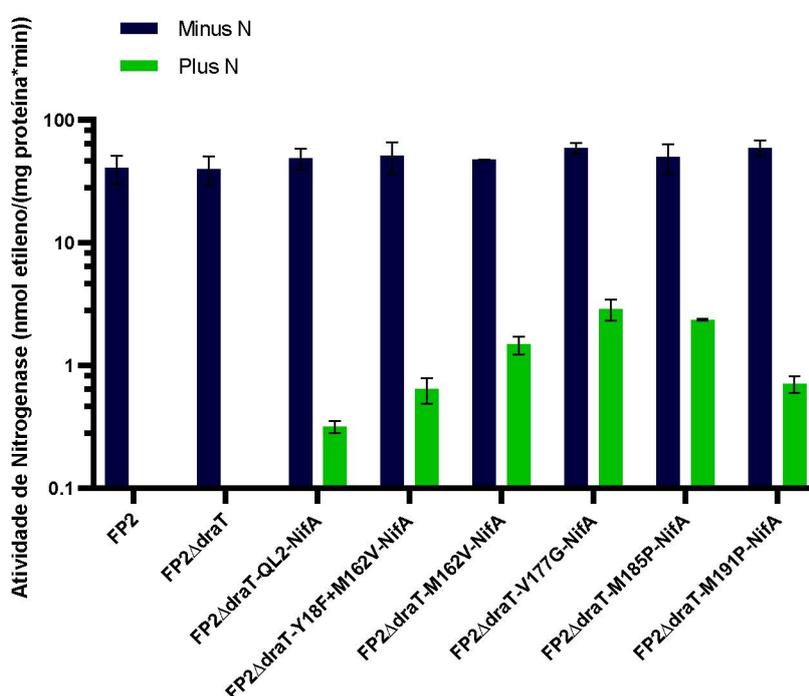
*primers*. As estirpes geradas foram denominadas FP2 $\Delta$ *draT* e FP2 $\Delta$ *nifA* $\Delta$ *draT*, oriundas das estirpes parentais FP2 e FP2 $\Delta$ *nifA*, respectivamente.

Com o objetivo de combinar mutações que cercassem os pontos de regulação tanto a nível transcricional quanto pós-traducional, a deleção do gene *draT* foi combinada às mutações pontuais de *nifA* descritas na seção 5.2.4.1. Para isso, as construções em pK18mobsacB contendo os fragmentos mutagênicos de *nifA* (ver Figura 21) foram transferidas para a estirpe FP2 $\Delta$ *nifA* $\Delta$ *draT* por conjugação biparental (seção 4.8). Essa estirpe continha deleção do gene *nifA* e, portanto, apresentava fenótipo Nif<sup>-</sup>. As etapas para obtenção de simples e duplo recombinantes foram feitas como descrito anteriormente (seção 5.2.4.1). A confirmação de mutantes duplos contendo deleção de *draT* e mutações em *nifA* foi feita por reações de PCR e sequenciamento, usando os mesmos *primers* e protocolos também descritos anteriormente na seção 5.2.4.1.

### 5.3.3 Caracterização de estirpes contendo mutagênese de DraT

Após a confirmação de todos os mutantes contendo deleção de *draT* de *A. brasilense*, foi avaliada a capacidade dos mesmos de fixar nitrogênio em meio NFbHP-lactato semi-sólido em condições de baixo amônio (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM de NH<sub>4</sub>Cl), utilizando o método de redução do acetileno (seção 4.11.1). O resultado dos ensaios de determinação de atividade de nitrogenase é mostrado na Figura 32.

**Figura 32 - Determinação de atividade da nitrogenase de mutantes contendo mutação nos genes *nifA* e *draT***



**Isolados da estirpe mutante contendo deleção do gene *draT* e de mutantes duplos contendo deleção de *draT* combinada às mutações pontuais ou truncagem no gene *nifA*, foram testados quanto à habilidade de fixação de nitrogênio. A estirpe FP2 foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio) utilizando o método de redução de acetileno, conforme descrito em materiais e métodos na seção 4.11.1. A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico, em escala log, estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelo menos dois experimentos representativos realizados em duplicata biológica.**

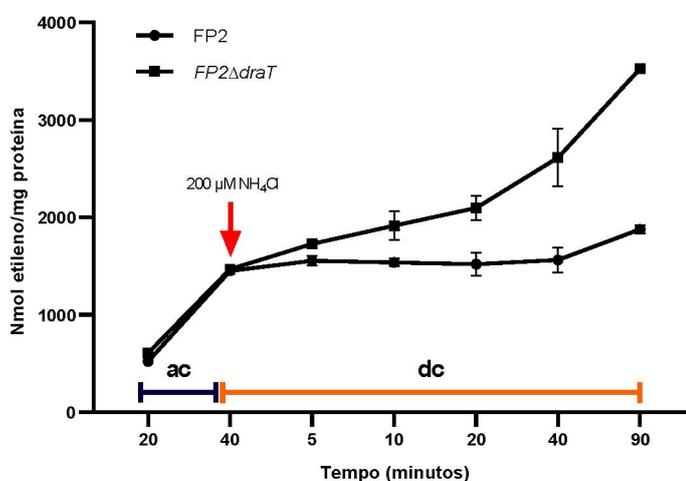
Os resultados apresentados na Figura 32 permitem concluir que, nas condições testadas, a deleção isolada do gene *draT* em *A. brasilense* (FP2 $\Delta$ *draT*) não altera de forma significativa o perfil de atividade da nitrogenase em comparação com a estirpe selvagem FP2, tanto em condições de fixação quanto de suficiência de nitrogênio. Esse resultado era esperado, já que o mutante FP2*draT* ainda apresentaria controle transcricional da expressão dos genes *nif* via regulação da atividade de NifA, apesar do mecanismo de inativação de NifH por ADP-ribosilação teoricamente estar inativo. Para detectar a falha no desligamento da nitrogenase por este mutante, seria necessário inicialmente realizar um cultivo da estirpe em condições de fixação de nitrogênio, de modo a permitir a desrepressão da nitrogenase e, em seguida, realizar um choque por amônio. Nesse ambiente, seria esperado a ausência da perda do fenótipo de fixação de nitrogênio, consistente com a supressão da função de DraT (ZHANG *et al.*, 1992). Este experimento foi executado e é descrito mais à frente ainda nesta seção (ver Figura 33).

Os resultados também mostram um perfil semelhante dos mutantes duplos FP2 $\Delta$ *draTnifA*\* ao obtido quando da avaliação das mesmas variantes de NifA em FP2 $\Delta$ *nifA* (seção 5.2.4.1; Figura 22); no entanto, as atividades de nitrogenase ocasionadas pelas variantes Y18F+M62V, V177G, M185P e M191 encontram-se significativamente aumentadas em relação às apresentadas no mutante FP2 $\Delta$ *nifA* em condições de baixo amônio ( $p < 0,025$ ), ao passo que, na presença de amônio, Y18F+M162V, V177G e M185P mostram aumento da atividade ( $p < 0,007$ ) enquanto M191P mostra o comportamento contrário ( $p < 0,005$ ). Analisando especificamente as variantes V177G e M185P, a proporção entre as atividades registradas naquele e neste mutante variam entre 1,49 - 1,58 em baixo nitrogênio e 1,83 - 1,92 em alto nitrogênio. Esses resultados apontam para um efeito perceptível da deleção do gene *draT* em *A. brasilense* sobre a atividade de nitrogenase dos mutantes pontuais cromossomais de *nifA*, embora não seja um efeito muito grande nas condições avaliadas. Estudo anterior conduzido por Arsene e colaboradores (1996) mostrou efeito semelhante quando plasmídeo expressando uma variante de NifA truncada no domínio GAF foi transferido para mutante contendo interrupção do *draT*, sugerindo que a deleção de parte da região N-terminal de NifA pode levar à atividade parcial de nitrogenase na presença de amônio uma vez que o processo de ADP-ribosilação de NifH encontra-se inativo.

Comparando com os dados dos experimentos de complementação de mutante (seção 5.2.2), a combinação das mutações nos genes *nifA* e *draT* no genoma de *A. brasilense* não foi suficiente para reproduzir as atividades específicas de nitrogenase da estirpe FP2 $\Delta$ *nifA* expressando as diferentes variantes de NifA a partir de 5-8 cópias de vetor plasmidial na presença de amônio (diferença de 6 a 26 vezes), condição em que a deleção de *draT* deveria manifestar seu maior efeito. Esse resultado indica que o sistema DraT-DraG de regulação da nitrogenase não é o responsável pela baixa atividade de nitrogenase detectada na presença de amônio nos experimentos descritos na seção 5.2.4.1, e reitera a hipótese de que essa diferença de fenótipo pode ser gerada por uma maior quantidade de proteína sendo expressa a partir de plasmídeo (efeito do número de cópias). Nesse caso, quantidades superiores de NifA poderiam aumentar exponencialmente a transcrição dos genes *nif*, o que resultaria em níveis de NifH possivelmente superiores à capacidade de inativação por DraT. Como resultado, a taxa de fixação de nitrogênio do mutante complementado seria superior à das estirpes expressando NifA cromossomicamente.

Com o intuito de comprovar que os fenótipos descritos no item 5.3.3 não eram decorrentes de uma possível falha na inativação do mecanismo de desligamento da nitrogenase, numa próxima etapa o mutante FP2 $\Delta$ *draT* foi utilizado em experimento de switch *on/off* da nitrogenase, conforme descrito no item 4.11.2. A conversão de acetileno a etileno foi monitorada antes e após choque com 200  $\mu$ M de NH<sub>4</sub>Cl e o resultado é mostrado na Figura 33 abaixo.

**Figura 33- Ensaio de *Switch on/off* da nitrogenase de mutante contendo deleção de *draT***



Células das estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ *draT* foram cultivadas em meio líquido em condição de limitação de nitrogênio mediante controle de D.O.<sub>600nm</sub> e concentração de oxigênio iniciais a 0,3 e 6%, respectivamente, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.2). Após 4 horas de desrepressão a 30°C e 120 rpm, os frascos foram injetados de acetileno correspondente a 10% da fase gasosa. Amostras gasosas foram coletadas 20 e 40 minutos após adição do substrato (ac, antes do choque) e; 5, 10, 20, 40 e 90 minutos após choque com 200  $\mu$ M de NH<sub>4</sub>Cl (dc, dois do choque). A seta em vermelho indica o ponto em que o amônio foi

adicionado (tempo zero - 40 minutos após adição de acetileno). Os resultados são expressos em nmol de etileno total formado por miligrama de proteína. As barras no gráfico indicam os desvio-padrão em torno da média a partir de um experimento representativo realizado em triplicata biológica.

O ensaio de switch *on/off* da nitrogenase mostra que ambas as estirpes exibem taxas semelhantes de fixação de nitrogênio de 20 a 40 minutos após adição de acetileno nos frascos, indicando ausência de repressão pelos níveis de oxigênio. Entretanto, após o choque por amônio, a nitrogenase da estirpe selvagem é imediatamente desligada, presumivelmente por modificação de NifH mediada por DraT. Os resultados também sugerem que cerca de 40 minutos após o choque o nitrogênio é exaurido, e na coleta de 90 minutos é possível notar o religamento da nitrogenase da estirpe selvagem. Por outro lado, a adição de 200  $\mu$ M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  não é capaz de inativar a nitrogenase da estirpe FP2 $\Delta$ *draT*, a qual permanece ativa durante todo o curso do ensaio.

A taxa de formação de etileno, que entre a primeira e a segunda coleta se apresentava em 50 nmol de etileno por miligrama de proteína por minuto, permaneceu bastante próxima a este valor no mutante FP2 $\Delta$ *draT* nos primeiros 10 minutos após a adição do amônio (em torno de 42,5 nmol por miligrama por minuto), em contraste com virtualmente zero na estirpe selvagem. Este resultado confirma que a deleção cromossomal do gene *draT* em *A. brasilense* é suficiente para contornar a regulação pós-traducional da nitrogenase em resposta a choque por amônio, e acresce a dados apresentados anteriormente (Figura 32).

Por outro lado, embora a deleção do gene *draT* tenha aumentado significativamente a habilidade dos mutantes pontuais de *nifA* de fixar nitrogênio em altos níveis de amônio, experimentos de excreção de amônio em cultura utilizando o método do indofenol (seção 4.12) mostraram que essas estirpes não são capazes de excretar amônio para o meio (dado não mostrado). Em conjunção, esses resultados sugerem que outros componentes regulatórios de sinalização do *status* de nitrogênio intracelular ainda estariam ativos e precisariam ser explorados para se poder encontrar uma explicação para a baixa eficiência dos mutantes de NifA em alto amônio. Subsequentemente, mutações nas proteínas GlnD e GlnE, que fazem modificação pós-traducional de GlnB/GlnZ e GS, respectivamente, foram caracterizadas com esta intenção (seção 5.6).

#### 5.4 Avaliação do efeito de mutação de GS em *A. brasilense*

Uma outra abordagem possível para gerar estirpes de *A. brasilense* excretoras de amônio, além do relaxamento dos pontos de regulação da expressão dos genes *nif* e de controle da nitrogenase através da mutagênese dos genes *nifA* e *draT*, respectivamente, consiste em

provocar um desacoplamento dos processos de fixação e assimilação de amônio, através da modificação dos mecanismos de sinalização do *status* de nitrogênio intracelular.

Como discutido anteriormente, o mutante HM053 de *A. brasilense* apresenta baixos níveis de atividade de GS, apesar de não apresentar adenililação eficiente de seus monômeros (MACHADO *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 2017). Como resultado da ausência de sinalização por glutamina, essa estirpe é capaz de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio. A justificativa para esse fenótipo tem sido atribuída a uma mutação pontual situada na posição 1040 do gene *glnA*, com a substituição de um nucleotídeo de citosina por timina e a subsequente troca de um resíduo de prolina por leucina na posição 347 (P347L) da glutamina sintetase (HAUER, 2012), que levaria a uma baixa atividade constitutiva de GS, irresponsiva à regulação positiva. Esta baixa atividade implica em pouca assimilação de amônio a glutamina, que por sua vez, resulta em um acúmulo de 2-oxoglutarato quando a células se encontram na presença de fontes de carbono suficientes para sustentar o metabolismo celular. Glutamina é um regulador positivo da atividade uridilil-removase da enzima GlnD (ARAÚJO *et al.*, 2008), e sua ausência implica em maior uridililação das proteínas GlnB e GlnZ. 2-oxoglutarato, por sua vez, é um efetor reconhecido diretamente por GlnB e GlnZ em *A. brasilense* (GERHARDT *et al.*, 2012), e a presença de proteínas PII uridililadas e ligadas a 2OG é um sinal intracelular interpretado como ausência de nitrogênio disponível, através de interações entre PII e diversas proteínas alvo (SOTOMAIOR *et al.*, 2012). Portanto, a baixa atividade de GS ocasionada pela mutação P347L implica em, mesmo na presença de amônio (que não pode ser assimilado na taxa necessária), *A. brasilense* possuir ativadas as proteínas que respondem à falta de nitrogênio fixado, gerando o fenótipo observado de fixação de nitrogênio constitutiva e excreção de amônio.

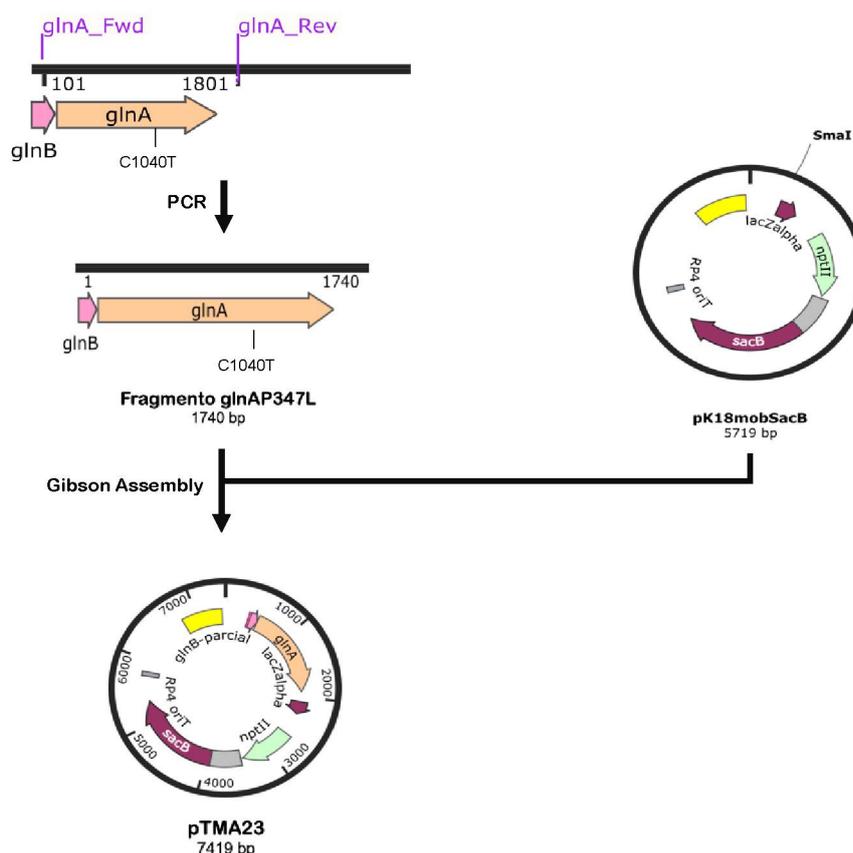
No entanto, apesar de a explicação acima ser bastante coerente com o que se sabe sobre a regulação do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense*, restam dúvidas quanto à sua veracidade. O mutante HM053 foi obtido em uma biblioteca de mutantes aleatórios selecionados por resistência ao composto etilenodiamina, que, ao ser degradado no sítio ativo de GS, produz um composto tóxico para a célula. Embora o método de seleção sugira que a mutação identificada é a relevante para o fenótipo, HM053 possui outras mutações ao longo do genoma em relação a FP2 (CHAGAS, 2013), e não se pode descartar que estas possam ter influência sobre o fenótipo observado. De modo a responder essa pergunta, optou-se por transferir a mutação pontual localizada no gene *glnA* da estirpe HM053 para a estirpe selvagem FP2, e depois combiná-la com algumas das mutações no gene *nifA* previamente avaliadas, a fim de obter informações sobre o quanto do fenótipo de HM053 seria explicado pela mutação

P347L, e o quanto do efeito da mutação P347L de GlnA estaria relacionada a seu efeito indireto sobre a atividade de NifA.

#### 5.4.1 Construção do plasmídeo mutagênico para inserção de mutação pontual de *glnA* no genoma de *A. brasilense*

Para a construção do plasmídeo mutagênico contendo a mutação C1040T em *glnA*, foi feita a amplificação desse gene a partir do DNA genômico da estirpe HM053 de *A. brasilense* utilizando os *primers* *glnA\_fwd* e *glnA\_rev*. O produto obtido continha 1741 pb e foi ligado a vetor pK18mob*sacB* linearizado no sítio *SmaI*, utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). O plasmídeo resultante, pTMA23, foi confirmado por reação de restrição com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, que geraram os fragmentos teóricos esperados de 5698 pb e 1721 pb, correspondentes ao vetor linearizado e inserto, respectivamente. Adicionalmente, a sequência clonada foi checada por reação de sequenciamento, também utilizando os *primers* *glnA\_fwd* e *glnA\_rev*. Um esquema representativo da construção do plasmídeo mutagênico de *glnA* é mostrado na Figura 34.

**Figura 34 - Representação esquemática da construção de plasmídeo mutagênico para inserção de mutação pontual de *glnA* no genoma de *A. brasilense***



O fragmento resultante da amplificação do gene *glnA* a partir do DNA genômico da estirpe HM053 foi ligado ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI*, através da técnica de Gibson Assembly. O plasmídeo mutagênico resultante, pTMA23, continha *glnA* de *A. brasilense* com a mutação C1040T e um cassete *sacBKm* para seleção de mutantes simples e duplos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas amplificações são mostrados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9.

#### 5.4.2 Construção de mutante contendo mutação pontual de *glnA* inserida no genoma

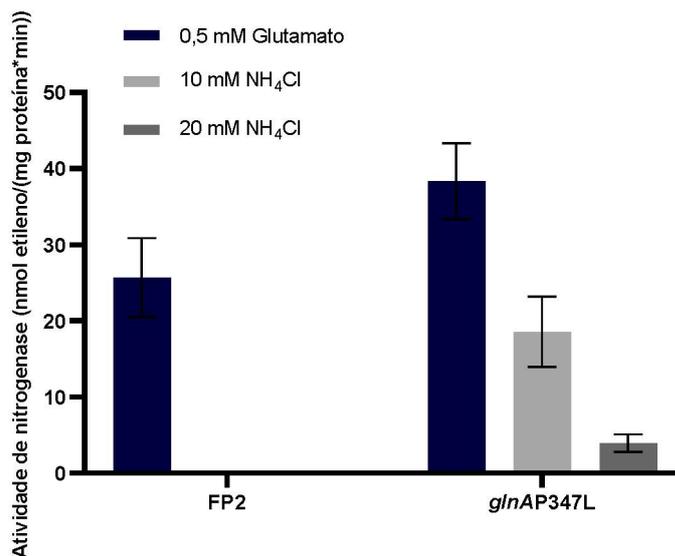
O plasmídeo pTMA23 foi transformado em *E. coli* S17.1 e então conjugado para *A. brasilense* FP2 utilizando a técnica de conjugação biparental, conforme descrito na seção 4.8. Colônias transconjugantes resistentes ao antibiótico canamicina foram confirmadas quanto à integração do plasmídeo no genoma. Uma vez que as cópias selvagem e mutante do gene apresentavam o mesmo tamanho por se tratar de uma mutação pontual, a seleção de mutante simples foi feita através de análise de restrição. Convenientemente, a posição 1040 do gene *glnA* de FP2 é envolvida na formação de um sítio de restrição para a enzima *BsiWI*, o qual é destruído pela mutação de citosina para timina em HM053. Sendo assim, o produto da amplificação do gene *glnA* a partir de colônias transconjugantes foi digerido com a enzima *BsiWI*, que gerou os fragmentos esperados de 1740 pb (cópia mutante proveniente de HM053) e; 1185 pb e 555 pb (produto da digestão da cópia selvagem de FP2).

Após a confirmação de mutantes simples pelo padrão de restrição esperado, estes foram cultivados para obtenção de mutantes duplos, como descrito no item 4.9.1. Colônias crescidas em placas contendo sacarose 10% e que mostraram sensibilidade ao antibiótico canamicina foram analisadas quando à ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga. A primeira etapa da confirmação foi feita por meio de reação de PCR e digestão com a enzima *BsiWI*, cujo produto revelou somente o fragmento de 1740 pb não cortado correspondente ao gene *glnA* de HM053, tal como descrito acima. Na segunda etapa, os prováveis mutantes duplos foram sequenciados com os *primers* *glnA\_fwd* e *glnA\_rev* para comprovar a inserção da mutação no códon desejado, e a estirpe produzida foi denominada *glnAP347L*.

#### 5.4.3 Caracterização de mutante contendo mutação pontual em GS

Uma vez confirmada a identidade da estirpe mutante de *glnAP347L*, foram iniciados os experimentos de caracterização bioquímica e fisiológica. Inicialmente, foi avaliada a capacidade de *glnAP347L* de fixar nitrogênio em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo baixo (0,5 mM glutamato) e alto amônio (10 e 20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), pelo método de redução do acetileno a etileno (seção 4.11.1). O resultado dos ensaios de determinação de atividade de nitrogenase é mostrado na Figura 35.

**Figura 35 - Determinação de atividade da nitrogenase do mutante *glnAP347L* cultivado em diferentes concentrações de amônio**

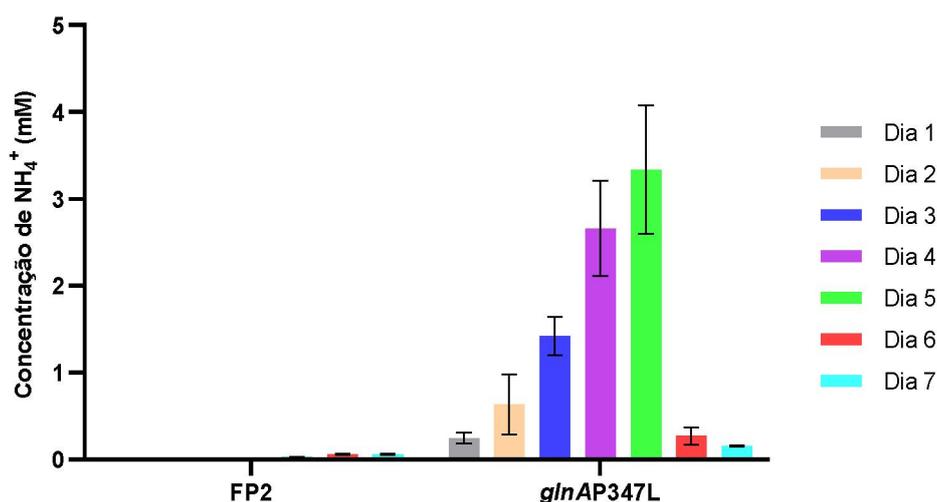


Isolados da estirpe mutante *glnAP347L* foram caracterizados quanto a atividade da nitrogenase. A estirpe parental FP2 de *A. brasilense* foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 e 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condições de alto amônio), utilizando o método de redução de acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade da nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata biológica.

A partir do ensaio de determinação de atividade de nitrogenase, é possível concluir que o mutante *glnAP347L* apresenta atividade de fixação de nitrogênio superior à estirpe selvagem FP2 em baixos níveis de amônio. Interessantemente, o mutante *glnAP347L* também fixa nitrogênio em condições de excesso de amônio, mesmo após cultivo em 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl, indicando que a mutação P347L de GlnA deve ser a maior responsável pelo fenótipo do mutante HM053. Entretanto, a atividade de específica de nitrogenase obtida para a estirpe *glnAP347L* após crescimento em 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl mostrou-se pelo menos duas vezes superior à de HM053 determinada por Machado e colaboradores (1991).

Numa próxima etapa, foi avaliada a capacidade do mutante *glnAP347L* de excretar amônio. Para isso, inicialmente foi realizado o cultivo da estirpe em meio NFbHP-lactato semi-sólido na ausência de qualquer fonte de nitrogênio e dosagens de amônio excretado foram feitas por um período de 7 dias. O método utilizado foi o do indofenol, o qual baseia-se na leitura de absorbância a 625 nm do produto formado a partir da reação entre amônia, fenol e hipoclorito em ambiente alcalino (seção 4.12). O resultado obtido é mostrado na Figura 36.

**Figura 36 - Ensaio de quantificação de amônio excretado pela estirpe *glnAP347L***



Isolados da estirpe mutante *glnAP347L* foram cultivados para ensaio quantificação de amônio. A estirpe parental FP2 de *A. brasilense* foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido sem qualquer fonte de nitrogênio. As dosagens de amônio a partir das culturas foram feitas por um período de 7 dias consecutivos utilizando o método do indofenol, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.12). As concentrações obtidas foram expressas em milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de dois experimentos representativos realizados em duplicatas biológicas.

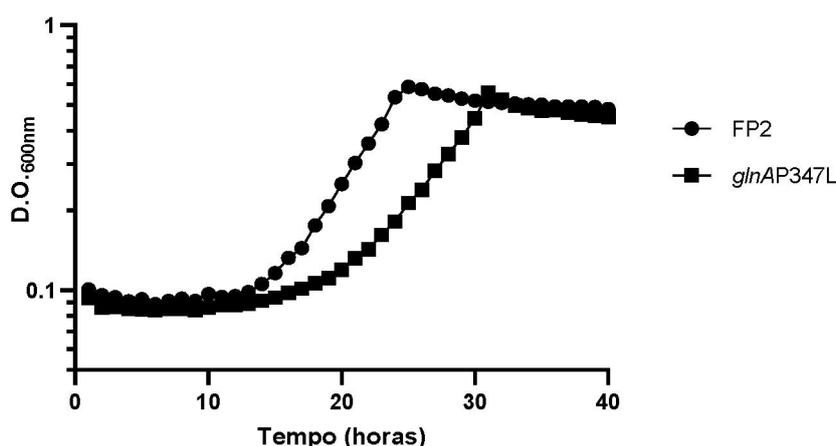
O ensaio de quantificação mostrou que a atividade constitutiva de nitrogenase de *glnAP347L* também é acompanhada por excreção de amônio a níveis milimolares, chegando até 3,5 mM, com uma taxa variando entre 0,3 e 1,5 mmol por dia. Esse resultado é consistente com dados experimentais obtidos para o mutante HM053, cujo pico de excreção gerou cerca de 3,5 mM de  $\text{NH}_4^+$  (MACHADO *et al.*, 1991). O perfil observado corrobora com a conclusão de que a mutação pontual C1040T no gene *glnA* é suficiente para gerar excreção de amônio em *A. brasilense*.

É possível que essa mutação resulte em uma alteração na expressão e/ou atividade de GS, o que leva a uma deficiência na síntese de glutamina, assim como observado para a estirpe HM053 (MACHADO *et al.*, 1991). Como já discutido, uma vez que glutamina é um sinal metabólico do *status* de nitrogênio na célula e influencia diretamente a atividade de proteínas regulatórias de modificação pós-traducional, como GlnD por exemplo, uma deficiência na sua síntese permitiria que a proteína PII GlnB estivesse sempre em sua forma uridililada (via atividade de UTase de GlnD). Nessas condições haveria a ativação constante da transcrição dos genes *nif* via interação PII-UMP e NifA, além da ausência de controle da nitrogenase. Como resultado, a fixação constitutiva de nitrogênio combinada à baixa atividade de GS resultaria em excreção de amônio. Curiosamente, a transferência dessa mutação para *Herbaspirillum seropedicae* gerou uma estirpe capaz de fixar nitrogênio em condições de suficiência de

nitrogênio, mas não foi observada excreção de amônio (Marcelo Bueno Batista, comunicação pessoal).

Devido à alta demanda energética requerida para o fenótipo observado em *glnAP347L*, especulou-se que essa estirpe apresentasse deficiência no crescimento. Numa próxima etapa de caracterização deste mutante, foi analisado o perfil de crescimento da mesma em condições de não-fixação de nitrogênio, a fim de evitar-se estresses metabólicos. Para esse experimento, o crescimento em meio líquido foi monitorado em leitor de microplaca de parâmetros controláveis, como descrito na seção 4.3.4, e o resultado é mostrado na Figura 37.

**Figura 37 - Perfil de crescimento do mutante *glnAP347L* relativo à estirpe selvagem FP2 de *A. brasilense***



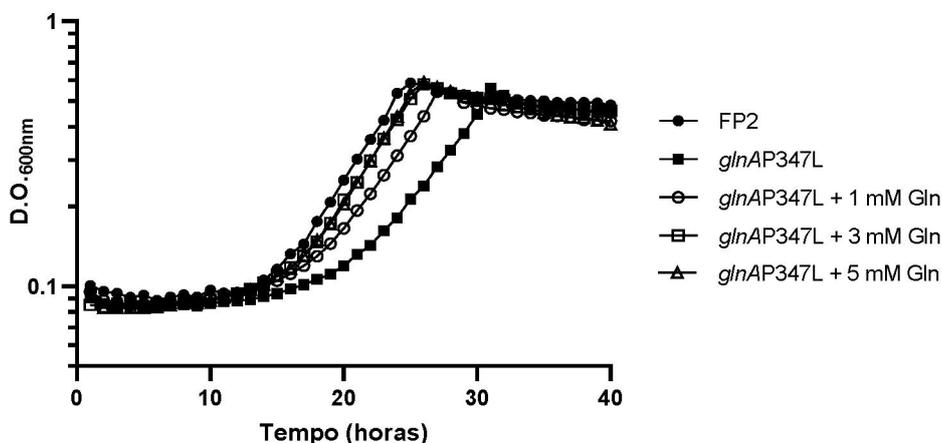
As estirpes FP2 e *glnAP347L* foram cultivadas em microplacas contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio NFbHP-lactato líquido (20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio) a 28°C. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm em leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

A Figura 37 mostra que a estirpe *glnAP347L* apresenta um perfil de crescimento distinto da estirpe selvagem FP2. Analisando as curvas obtidas, é possível notar que o mutante atinge o final da fase exponencial somente após 30 horas de cultivo, e sua taxa de crescimento ( $\text{td} \cong 5,4$  horas;  $\text{tl} \cong 18,0$  horas) é visivelmente inferior quando comparada à da estirpe FP2 ( $\text{td} \cong 4,2$  horas;  $\text{tl} \cong 13,0$  horas,  $p < 0,05$ ), cuja fase estacionária inicia-se após cerca de 25 horas de cultivo. Esse resultado é consistente com os testes de morfologia de colônia feitos em meio sólido, os quais mostraram que o mutante cresce mais lentamente e forma colônias consideravelmente menores quando comparadas às da estirpe selvagem (dado não mostrado).

Uma vez que o mutante *glnAP347L* parece apresentar baixa atividade de GS, foi avaliada também o efeito da adição de diferentes concentrações de glutamina em seu perfil de

crescimento. O experimento foi realizado conforme descrito no item 4.3.4, e os resultados são apresentados na Figura 38.

**Figura 38 - Efeito da adição de diferentes concentrações de glutamina no perfil de crescimento do mutante *glnAP347L***



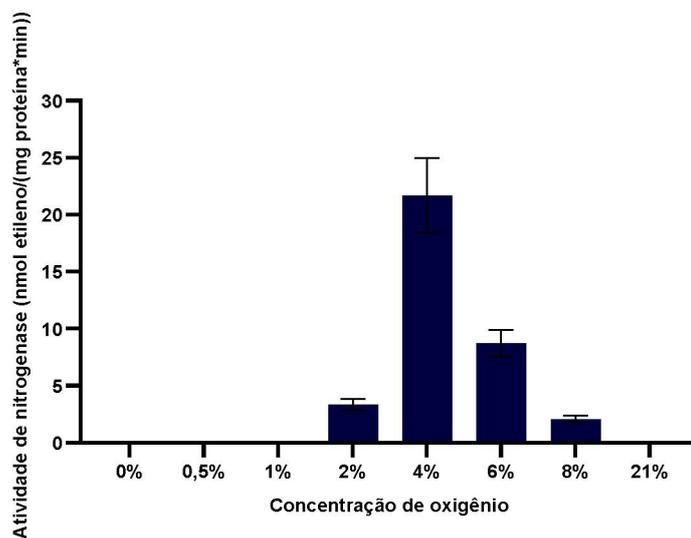
A estirpe *glnAP347L* foi cultivada em microplaca contendo 500  $\mu$ L de meio NFbHP-lactato líquido (20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio) a 28°C. Concentrações de 1, 3 e 5 mM de glutamina foram suplementadas ao meio, a fim de verificar alteração no perfil de crescimento da estirpe mutante. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm usando um leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

Como mostra a Figura 38, a adição de 1 mM de glutamina melhora significativamente o perfil de crescimento da estirpe *glnAP347L*, a qual passa a apresentar uma fase lag menos longa (tl  $\cong$  16,0 horas) quando comparada à estirpe crescida sem nenhuma suplementação (tl  $\cong$  18,0 horas). Além disso, a adição de 3 mM de glutamina elimina quase que completamente a deficiência no crescimento do mutante, cuja taxa de crescimento (td  $\cong$  4,1 horas; tl  $\cong$  13,0 horas) torna-se mais próxima à da estirpe selvagem FP2 (td  $\cong$  4,2 horas; tl  $\cong$  13,0 horas,  $p > 0,05$ ). A adição de concentrações superiores parece não ter efeito cumulativo no crescimento do mutante, e não foi verificado efeito atípico no crescimento de FP2 cultivado em meio suplementado com glutamina (dados não mostrados). Esses resultados sustentam a hipótese de que o fenótipo observado para o mutante *glnAP347L* esteja relacionado a uma baixa atividade de GS, já que que a suplementação de glutamina melhora consideravelmente sua taxa de crescimento.

Com vistas a melhor caracterizar o fenótipo de *glnAP347L*, foi realizada a quantificação de transcritos do gene *nifA* em condições de limitação e excesso de amônio por meio da técnica de RT-qPCR, conforme descrito no item 4.6. De modo a evitar repressão da expressão e/ou atividade de *nifA* em resposta a altos níveis de oxigênio, foi inicialmente determinada a concentração de oxigênio necessária para obtenção de atividade máxima de nitrogenase em

meio líquido, já que nessas condições a expressão de *nifA* não seria regulada. Para isso, células de *A. brasilense* foram cultivadas em meio NFbHP-lactato (livre de amônio) sob diferentes concentrações de O<sub>2</sub> na fase gasosa dos frascos, de forma análoga ao método descrito na seção 4.6.1. O resultado do ensaio para otimização da atividade da nitrogenase em meio líquido é mostrado na Figura 39.

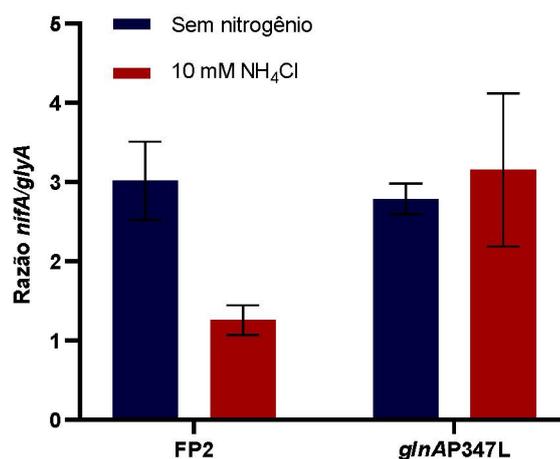
**Figura 39 - Titulação de oxigênio da atmosfera gasosa de frascos para ARA em meio líquido**



Células de *A. brasilense* FP2 provenientes de uma cultura saturada foram transferidas para frascos contendo meio NFbHP-lactato líquido (livre de amônio) para uma D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0.3. Os frascos foram vedados com tampas de borracha do tipo *suba-seal* para realização de troca da atmosfera gasosa para nitrogênio. A concentração de oxigênio na fase gasosa dos frascos foi ajustada para as concentrações indicadas no gráfico e, em seguida, foi feita uma incubação a 30°C e 120 rpm por um período de 4 horas antes do início do ensaio de redução do acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade da nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata biológica.

A partir dos resultados acima, decidiu-se estabelecer a concentração de 4% de oxigênio na fase gasosa dos frascos. Depois de cultivadas nas condições descritas na seção 4.6.1, as culturas de FP2 e *glnAP347L* usadas neste experimento tiveram seu RNA total extraído, conforme descrito na seção 4.6.2. A quantificação relativa de transcritos de *nifA* foi feita como descrito na seção 4.6.3 utilizando os *primers* *nifA*-RTqPCR1\_fwd e *nifA*-RTqPCR1\_rev, e normalizada pela quantificação de transcritos do gene de referência *glyA*, amplificado com os *primers* *glyA*-RTqPCR1\_fwd e *glyA*-RTqPCR1\_rev. O resultado é mostrado na Figura 40 abaixo.

**Figura 40 - Avaliação dos níveis de expressão de *nifA* a partir da estirpe *glnAP347L* cultivada na ausência ou presença de amônio**



As reações de RT-qPCR foram realizadas conforme descrito na seção de material e métodos usando as estirpes FP2 e *glnAP347L*, as quais foram cultivadas em meio NFBHP-lactato na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl. A determinação dos níveis de transcritos de *nifA* foi feita por meio de quantificação relativa usando o gene *glyA* como referência. As barras de erro representam os desvios-padrão de pelo menos três experimentos realizados em duplicata.

A partir dos dados obtidos é possível observar que a transcrição do gene *nifA* da estirpe selvagem FP2 é parcialmente reprimida por altas concentrações de amônio ( $p=0,000133$ ) (aproximadamente 42% dos níveis observados em ausência de nitrogênio), o que é condizente com dados descritos na literatura (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). Por outro lado, o promotor de *nifA* da estirpe *glnAP347L* não é regulado negativamente em resposta ao *status* de nitrogênio intracelular, uma vez que os níveis de transcritos obtidos para as duas condições testadas foram similares. Este resultado auxilia na explicação do fenótipo observado nos experimentos de determinação de atividade de nitrogenase e excreção de amônio; ao menos parte do efeito pode ser causado pelo aumento da expressão de *AbNifA*, por mecanismo ainda não elucidado.

### 5.5 Avaliação do efeito da adição de mutações ativadoras de NifA no mutante *glnAP347L*

Tendo em vista os ensaios de complementação de mutante descritos nos itens 5.2.2 e 5.2.3, e o fenótipo das estirpes contendo mutações pontuais de *nifA* inseridas no genoma, descritas no item 5.2.4.1, levantou-se a hipótese de que a transferência de mutações ativadoras de *nifA* para a estirpe *glnAP347L*, a qual parece não apresentar regulação do promotor de *nifA* em resposta ao *status* de nitrogênio intracelular, poderia aumentar ainda mais os níveis de fixação da mesma em condições de suficiência de nitrogênio. A avaliação do fenótipo de estirpes contendo mutações tanto em *glnA* quanto em *nifA* também ajudaria a entender se a atividade de nitrogenase em presença de amônio no mutante *glnAP347L* já se encontra no máximo capaz de ser promovido por *AbNifA*, ou se neste mutante ainda ocorre alguma

regulação negativa da atividade de NifA que o impeça de atingir seu máximo potencial de fixação de nitrogênio em presença de amônio.

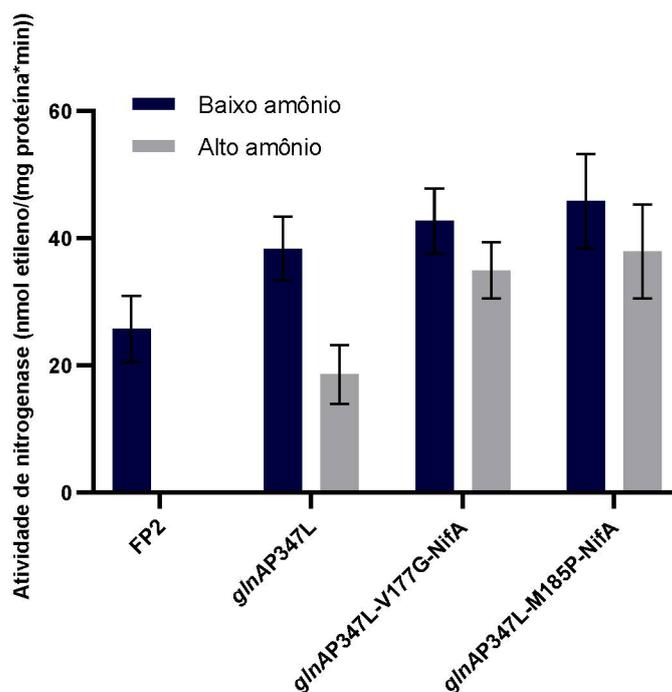
### 5.5.1 Construção das estirpes mutantes duplas nos genes *glnA* e *nifA* de *A. brasilense*

Para construção dos mutantes duplos em *glnA* e *nifA*, optou-se por utilizar apenas as substituições V177G e M185P de NifA, as quais pareceram ser mais promissoras, em termos de atividade máxima gerada, ao longo dos ensaios de determinação de atividade da nitrogenase (seções 5.2.2, 5.2.3, 5.2.4.1 e 5.3.3) e de ativação de fusão transcricional em *E. coli* (seção 5.1.3). A estratégia utilizada para a combinação das mutações baseou-se no uso do vetor suicida contendo o fragmento *sacB Km*. Para facilitar as etapas de confirmação de simples e duplo recombinantes, inicialmente foi feita a deleção completa do gene *nifA* na estirpe *glnAP347L* utilizando o plasmídeo mutagênico pTMA2003, de forma idêntica à descrita na seção 5.2.4.1. As etapas de confirmação de mutante foram feitas por reação de PCR e sequenciamento, como também detalhado na seção 5.2.4.1. A estirpe resultante, denominada *glnAP347LΔnifA*, foi usada para a restituição de *nifA* com as mutações pontuais T530G ou A553C e T554C, utilizando os mesmos plasmídeos mutagênicos empregados para a construção das estirpes FP2-V177G-NifA e FP2-M185P-NifA, respectivamente, conforme descrito na seção 5.2.4.1. A confirmação de recombinantes homólogos simples e duplos foi feita por meio de reações de PCR e sequenciamento, como também descrito na seção 5.2.4.1. Os mutantes duplos produzidos foram denominados *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA*, e continham a mutação pontual P347L em GS combinada às mutações V177G ou M185P de NifA, respectivamente.

### 5.5.2 Caracterização de mutantes contendo mutações pontuais em GS e NifA

Após a confirmação da identidade dos mutantes duplos selecionados, foram iniciados os experimentos de caracterização. Inicialmente, foi determinada a atividade da nitrogenase pelo método de redução do acetileno a etileno, conforme descrito na seção 4.11.1. Para esse ensaio, as estirpes foram cultivadas em meio NFbHP-lactato semi-sólido em condições de baixo amônio (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM NH<sub>4</sub>Cl). Os resultados obtidos estão compilados na Figura 41.

**Figura 41 - Determinação de atividade da nitrogenase dos mutantes duplos de GS e NifA em condições de baixos e altos níveis de amônio**



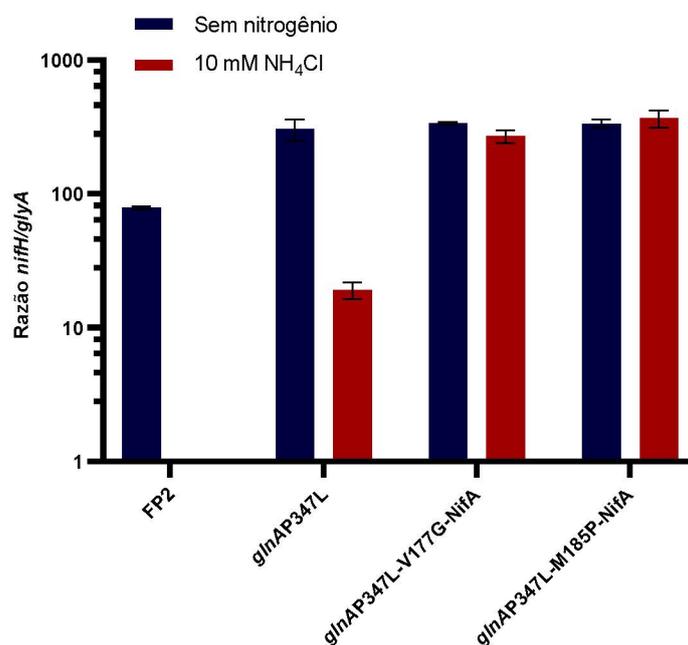
Isolados das estirpes mutantes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* foram cultivados para ensaio de atividade de nitrogenase. As estirpes FP2 e *glnAP347L* foram adicionadas como controles experimentais. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamina (condição de baixo amônio) ou 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (condição de alto amônio), utilizando o método de redução de acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata biológica.

De acordo com a Figura 41, não se observa uma grande diferença na atividade de nitrogenase na ausência de amônio entre a estirpe *glnAP347L* e as estirpes dela derivadas que contém as mutações em *nifA*, embora as diferenças tenham sido estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ); porém, na presença de amônio, a combinação da mutação P347L de GS com as mutações V177G ou M185P de NifA gera estirpes com capacidade de fixação de nitrogênio claramente superior à da estirpe parental *glnAP347L* ( $p < 0,001$ ). Esse resultado concorda com o modelo anteriormente discutido, segundo o qual as proteínas *AbV177G-NifA* e *AbM185P-NifA* seriam menos responsivas aos níveis de nitrogênio intracelular quando comparadas à NifA selvagem de *A. brasilense*. Da mesma forma, estes resultados sugerem que, no mutante *glnAP347L*, ainda ocorre supressão parcial da atividade de NifA na presença amônio, a despeito do efeito que se presume que esta mutação cause na cascata regulatória do metabolismo de nitrogênio. Além disso, esses resultados são condizentes com os dados dos experimentos de complementação de mutante *nifA* (seção 5.2.2) e, em conjunto, sugerem que, pelos menos em parte, o fenótipo de baixa FBN na presença de amônio observado para os mutantes pontuais

cromossomais de *NifA* descritos no item 5.2.4.1 esteja relacionado a um maior controle do promotor de *nifA* nessas estirpes.

Numa próxima etapa, foi investigado se os mutantes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* apresentariam maiores níveis de expressão de *nifH* em comparação com a estirpe parental *glnAP347L*, já que estes mostraram ser capazes de fixar nitrogênio a uma taxa superior. Para isso, as estirpes foram cultivadas na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , utilizando as mesmas condições de cultivo apresentadas na seção 4.6.1, e, em seguida, foi feita a extração de RNA total, seguida da síntese de cDNA e análise de transcritos de *nifH* através da técnica de RT-qPCR (*primers* *nifH-RTqPCR1\_fwd/nifH-RTqPCR1\_rev* e *glyA-RTqPCR1\_glyA/nifH-RTqPCR1\_rev*), conforme descrito em detalhes na seção 4.6. O resultado da quantificação relativa de transcritos é mostrado na Figura 42 abaixo.

**Figura 42 - Avaliação dos níveis de expressão de *nifH* nos mutantes duplos de GS e *NifA* cultivados na ausência ou presença de amônio**



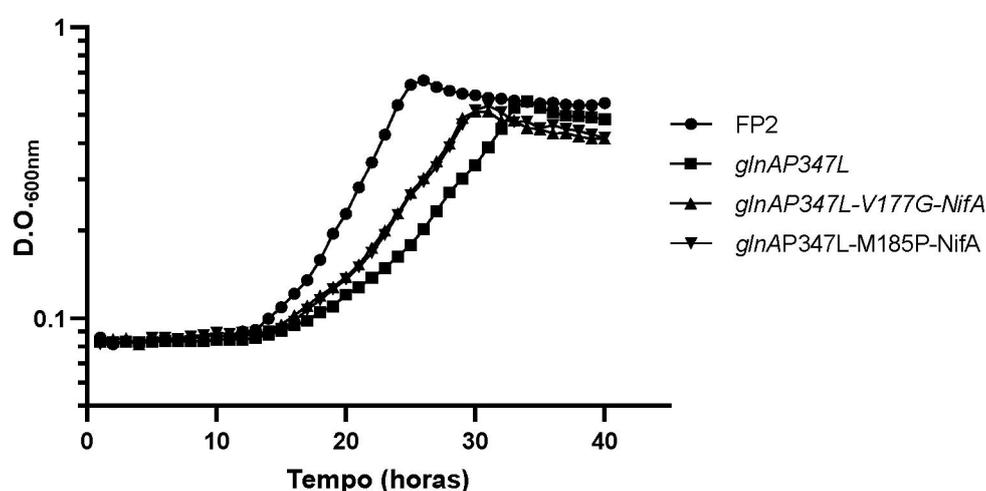
As reações de RT-qPCR foram realizadas conforme descrito na seção de material e métodos usando as estirpes FP2, *glnAP347L*, *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA*, as quais foram cultivadas em meio NFbHP-lactato na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A determinação dos níveis de transcritos de *nifH* foi feita por meio de quantificação relativa usando o gene *glyA* como referência. As barras de erro representam os desvios-padrão de um experimento realizado em duplicata biológica.

Os resultados das reações de PCR quantitativas mostraram ausência de expressão de *nifH* na estirpe FP2 cultivada em altos níveis de amônio, como esperado. A quantidade de transcritos detectada nas estirpes mutantes *glnAP347L*, *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* na ausência de nitrogênio foi superior à da estirpe selvagem

( $p < 0,025$ ), o que é condizente com as taxas de fixação de nitrogênio maiores obtidas nos ensaios de determinação de atividade da nitrogenase, embora deva-se notar que a expressão cerca de quatro vezes maior de nitrogenase nos mutantes não levou a um aumento da mesma magnitude na taxa de redução de acetileno. Condizente com os resultados anteriores, a expressão de *nifH* nos mutantes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* em condições de alto amônio é significativamente superior em relação à do mutante *glnAP347L* ( $p < 0,009$ ), embora, novamente, deva-se notar que o aumento de expressão não foi acompanhado por aumento da atividade da nitrogenase em igual proporção. Esse resultado contribui com o modelo proposto de que as variantes pontuais de NifA de *A. brasilense* construídas nesse estudo são menos responsivas à concentração de nitrogênio na célula, e reforça a ideia de que NifA selvagem não atinge sua atividade máxima no mutante *glnAP347L*, a despeito da desregulação do metabolismo de nitrogênio ocasionada pela mutação em GS. Os resultados também apontam para a incapacidade do sistema DraT-DraG em contrabalançar a alta atividade de NifA em *glnAP347L* e estirpes derivadas, inativando a nitrogenase – o que era esperado, dada a dependência do sistema DraT-DraG da sinalização por GlnD-PII, que encontra-se afetado nestas estirpes devido à alteração nos mecanismos sinalização por glutamina.

Em seguida, foi avaliado o perfil de crescimento dos mutantes duplos *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* em meio NFbHPN-lactato utilizando leitor de microplaca de parâmetros controláveis, conforme descrito na seção 4.3.4. Para este experimento, foram adicionados como controles a estirpe selvagem FP2 e a estirpe excretora de amônio *glnAP347L*. O resultado é mostrado na Figura 43.

**Figura 43 - Perfil de crescimento dos mutantes duplos de GS e NifA relativo às estirpes FP2 e *glnAP347L***



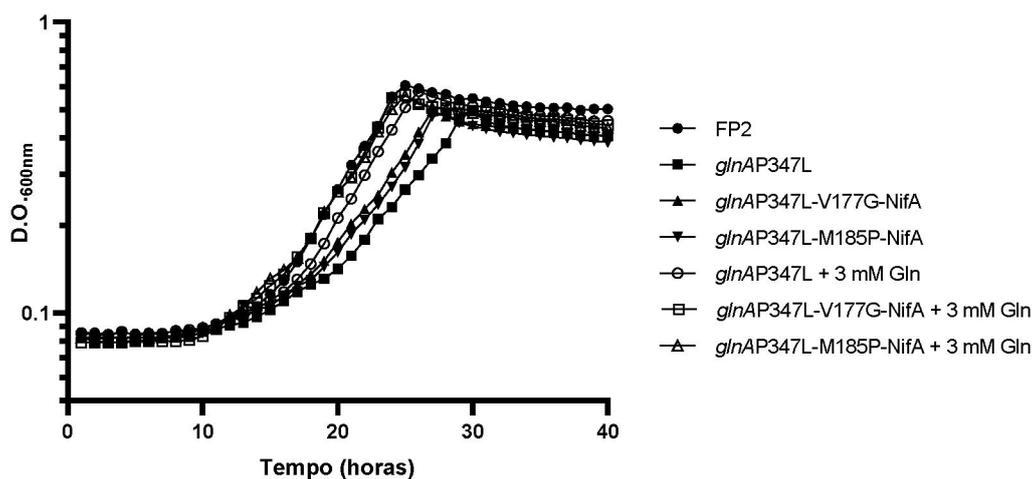
As estirpes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* foram cultivadas em microplacas contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio NFbHP-lactato líquido (20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio) a 28°C. As estirpes FP2 e *glnAP347L* também foram adicionadas como controles experimentais. O crescimento das culturas foi

acompanhado através da determinação da densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm em leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento das estirpes a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

Observa-se inicialmente que o comportamento das estirpes controle FP2 (tl  $\cong$  13,0 horas; td  $\cong$  3,8 horas) e *glnAP347L* (tl  $\cong$  20,0 horas; td  $\cong$  5,4 horas) foi relativamente semelhante ao observado em experimento anterior (Figura 37). Ao menos nas condições testadas, os mutantes duplos *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* apresentaram um perfil de crescimento idêntico entre si (média tl  $\cong$  16,0 horas, média td  $\cong$  5,0 horas,  $p > 0,05$ ), dada a sobreposição das curvas. Além disso, comparando com a estirpe parental *glnAP347L*, parecem exibir um final de fase lag menos tardio, apesar de não se comportarem como a estirpe selvagem FP2. Esse resultado é curioso, visto que teoricamente a demanda energética nos mutantes duplos é maior dada sua alta taxa de fixação de nitrogênio. Por outro lado, as curvas de crescimento foram realizadas na presença de 20 mM de  $\text{NH}_4\text{C}$  e 15% de ácido láctico na concentração inicial, e, nessas condições, é esperado que o gasto energético adicional de fixar mais nitrogênio não seja grande o bastante para gerar carência de carbono, e seja mais do que compensado pela vantagem de crescimento proporcionada pela maior assimilação de nitrogênio.

Num segundo experimento, testou-se o efeito da adição de glutamina ao meio de cultivo, tal como feito na seção 5.4.3. Assim como anteriormente, para este experimento foram adicionados como controles a estirpe selvagem FP2 e a estirpe excretora de amônio *glnAP347L*. Uma vez que o resultado apresentado na Figura 38 mostrou que a suplementação de 3 mM de glutamina melhorava significativamente o crescimento da estirpe mutante *glnAP347L*, esta mesma concentração foi utilizada para o cultivo dos mutantes duplos. Os resultados são apresentados na figura 44.

**Figura 44 - Efeito da adição de glutamina no perfil de crescimento dos mutantes duplos de GS e NifA**



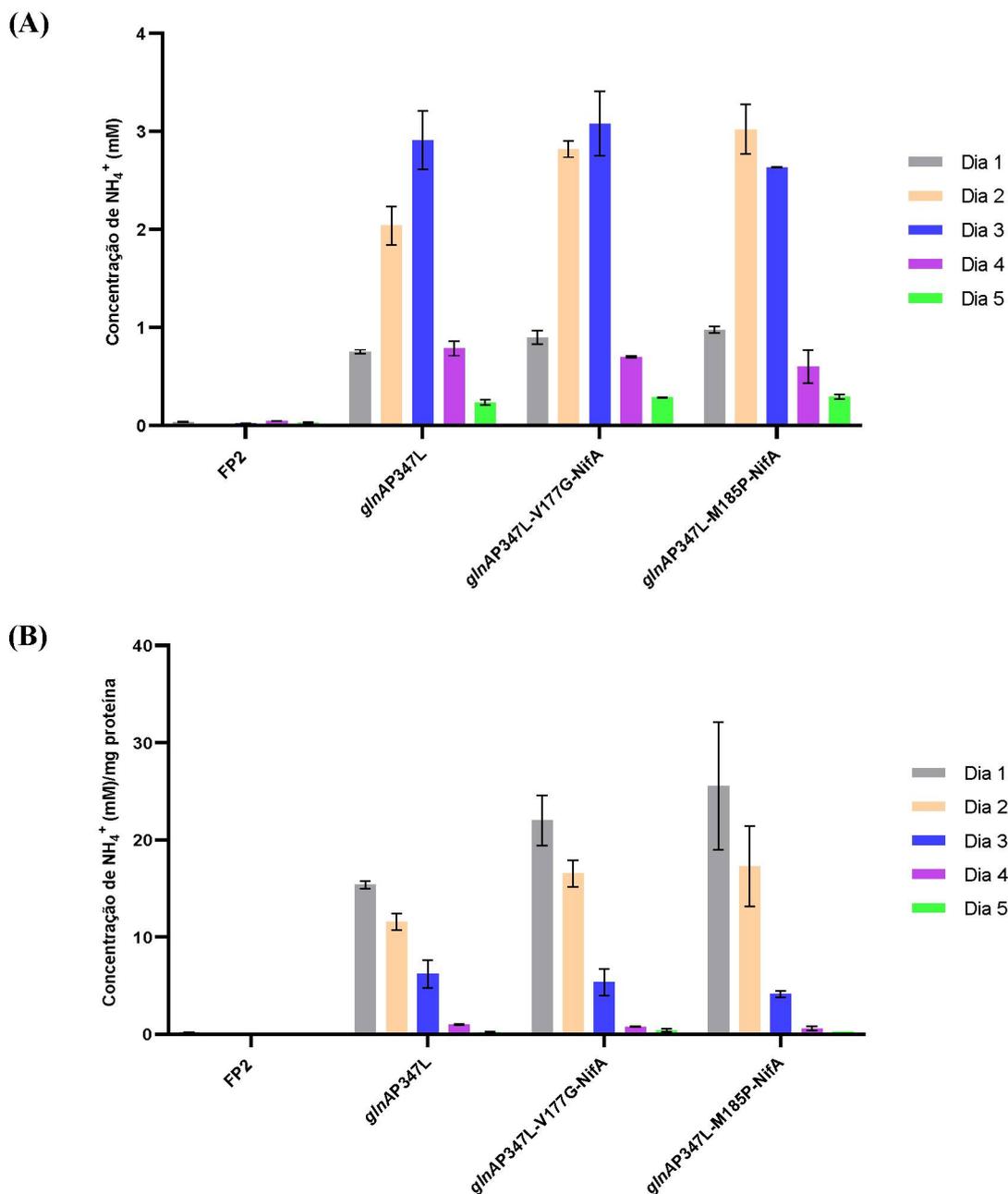
As estirpes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* foram cultivadas em microplaca contendo 500  $\mu$ L de meio NFbHP-lactato líquido (20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio) a 28°C. Adicionalmente, 3 mM de glutamina foram suplementados ao meio a fim de verificar alteração no perfil de crescimento dos mutantes duplos. As estirpes FP2 e *glnAP347L* também foram adicionadas como controles experimentais. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm usando leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

Comparando com experimentos anteriores, foi possível observar um comportamento reprodutível das estirpes controle (FP2 e *glnAP347L*), tanto na ausência quanto na presença de glutamina. Em relação aos mutantes duplos *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA*, foi verificada uma melhora considerável na taxa de crescimento com a adição de glutamina (média tl  $\cong$  13,5 horas; média td  $\cong$  4,2 horas), a qual tornou as taxas de crescimento de ambas as estirpes comparáveis à da estirpe selvagem FP2 (tl  $\cong$  12,0 horas; td  $\cong$  4,1 horas,  $p > 0,05$ ). Este resultado sugere que o menor déficit de crescimento dos mutantes duplos nos genes *glnA* e *nifA* esteja relacionado a uma menor deficiência na biossíntese de glutamina intracelular, o que pode ser vantajoso do ponto de vista de competitividade destas estirpes no solo e performance enquanto disponibilizadoras de nitrogênio fixado para as plantas.

Considerando a alta taxa de fixação de nitrogênio das estirpes duplo-mutantes, decidiu-se investigar se a adição das mutações V177G e M185P à estirpe *glnAP347L* também resultaria em maiores níveis de excreção de amônio. Para isso, as linhagens foram crescidas em meio NFbHP-lactato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamina, conforme descrito na seção 4.12. Isso foi feito devido a experimentos prévios de crescimento mostrarem que as estirpes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* apresentam crescimento mais lento em meio semi-sólido sem nenhuma fonte de nitrogênio quando comparadas à estirpe

*glnAP347L* (dado não mostrado). Dessa forma, a adição de glutamina permitiria que as estirpes crescessem a uma taxa mais similar, gerando resultados mais comparáveis. Os resultados dos ensaios de dosagem de amônio usando o método do indofenol são mostrados na Figura 45 (A e B).

**Figura 45 – Ensaio de quantificação de amônio excretado pelos mutantes duplos de GS e NifA**



Isolados dos mutantes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* foram submetidos ao ensaio quantificação de amônio. A estirpe parental FP2 e a estirpe excretora de amônio *glnAP347L* de *A. brasilense* foram adicionadas como controles experimentais. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamina. As dosagens de amônio a partir das culturas foram feitas por um período de 5 dias consecutivos utilizando o método do indofenol, conforme descrito nos materiais e métodos (seção 4.12). As concentrações obtidas foram expressas em milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado

(A) e milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado/mg proteína total da cultura (B). Nos gráficos estão indicados os desvios-padrão em torno da média de ao menos três experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

Os ensaios de quantificação de amônio mostraram que as estirpes mutantes duplas apresentam, notoriamente, uma tendência de maior excreção de amônio nos primeiros dois dias de quantificação quando comparadas à estirpe *glnAP347L* (45A), sendo essa diferença mais evidente nos dados de normalização pelo conteúdo proteico (45B). Esse resultado é consistente com os ensaios de determinação de atividade de nitrogenase, já que os mutantes *glnAP347L-V177G-NifA* e *glnAP347L-M185P-NifA* fixam nitrogênio a uma maior taxa, o que permite uma antecipação do acúmulo e, subsequentemente, excreção de amônio. Por outro lado, é válido ressaltar que a diferença dos níveis de excreção de amônio entre as estirpes testadas não parece ser tão acentuada como era esperado, o que sugere que possivelmente existam outros mecanismos regulatórios relacionados ao acoplamento dos processos de fixação e excreção de amônio que ainda estejam ativos. Uma outra justificativa para o fenótipo observado seria que as mutações combinadas levam a um platô do metabolismo energético, e que mutações adicionais poderiam gerar estirpes com grande deficiência de crescimento por serem energeticamente inviáveis.

## 5.6 Avaliação do efeito da mutagênese de GlnE e GlnD em *A. brasilense*

Conforme discutido anteriormente, a excreção de grandes quantidades amônio por organismos diazotróficos é dependente de uma alta taxa de fixação de nitrogênio combinada a uma baixa eficiência das vias de assimilação de amônio. Em *E. coli* e na maioria das proteobactérias, a assimilação de amônio é controlada de acordo com as concentrações de glutamina e 2-oxoglutarato intracelular através da modulação da atividade de GS por GlnE, que por sua vez tem sua atividade influenciada pelo estado de uridililação das proteínas PII, que é controlado por GlnD. Portanto, a integração de sinais metabólicos por duas proteínas bifuncionais GlnD (UTase/UR) e GlnE (ATase/AR), forma uma cascata bicíclica para controlar a atividade de GS. Nesta seção, buscou-se avaliar o efeito da mutagênese dessas duas proteínas no metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense*.

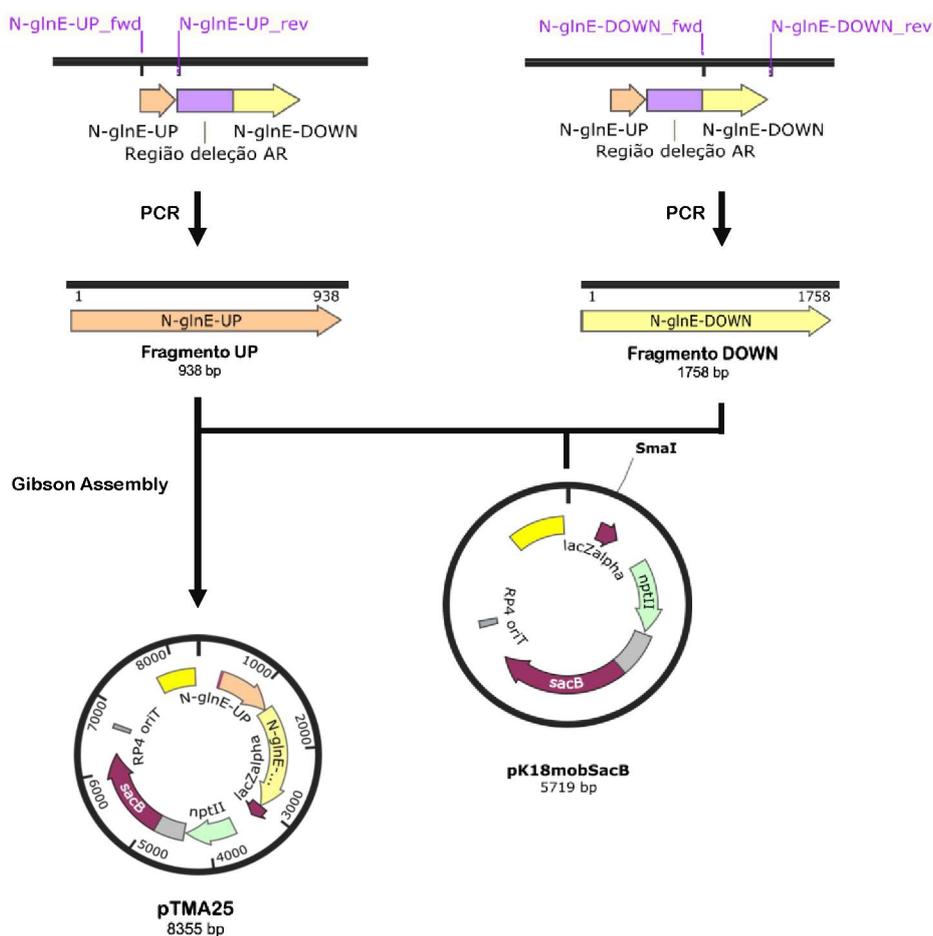
### 5.6.1 Construção de plasmídeo mutagênico para a deleção da porção 5' de *glnE*

Inicialmente optou-se por fazer a deleção do domínio N-terminal de GlnE, responsável pela atividade de remoção de grupos adenilil (AR) de GS, ativando-a. A escolha da porção a ser deletada foi feita considerando estudos prévios conduzidos por Ninfa e colaboradores (2007), nos quais foi mostrado que a deleção dos 424 resíduos de aminoácidos iniciais de GlnE

de *E. coli* YMC10 gerou uma proteína deficiente na atividade AR e menos responsiva a PII ou PII-UMP.

Após a identificação da região correspondente à GlnE truncada de *E. coli* em *A. brasilense* por meio de análises de alinhamento de sequências utilizando o algoritmo ClustalW no programa MEGAX, foi feita a amplificação das regiões localizadas à montante (-905 – 3) (938 pb) e à jusante (1366 – 3093) (1758 pb) da região alvo de deleção por meio de reação de PCR utilizando os *primers* glnE-UP\_fwd/glnE-UP\_rev e glnE-DOWN\_fwd/glnE-DOWN\_rev, respectivamente, e os fragmentos obtidos ligados ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI*, por meio de uma reação única utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). O plasmídeo resultante, denominado pTMA25, foi confirmado por meio da digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *EcoRI*, que geraram os fragmentos teóricos esperados de 5692 pb do vetor linearizado e 2663 pb do inserto. Em seguida, a sequência clonada no vetor também foi checada por reação de sequenciamento utilizando os *primers* glnE-UP\_fwd e glnE-conf\_fwd. Um esquema representativo da construção do plasmídeo mutagênico de *glnE* é mostrado na Figura 46.

**Figura 46 - Construção de plasmídeo mutagênico para a truncagem da porção 5' de *glnE* no genoma de *A. brasilense***



Os fragmentos resultantes da amplificação das regiões localizadas à montante (fragmento UP, mostrado em laranja) e à jusante (fragmento DOWN, mostrado em amarelo) da porção 5' do gene *glnE* (mostrado em lilás) a partir do DNA genômico da estirpe FP2, foram ligados ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI*, através da técnica de Gibson Assembly. O plasmídeo mutagênico resultante, pTMA25, continha o fragmento UP-DOWN da região N-terminal do gene *glnE* e um cassete *sacBkm* para seleção de mutantes simples e duplos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas amplificações são mostrados em lilás e suas sequências podem ser obtidas na Tabela 9.

### 5.6.2 Construção de mutante contendo deleção da região 5' de *glnE* no genoma

Após a confirmação da correta construção do vetor mutagênico pTMA25, este foi transformado em *E. coli* S17.1 e então conjugado para *A. brasilense* FP2 utilizando a técnica de conjugação biparental já descrita (seção 4.8). A confirmação de recombinantes simples foi feita por meio de reação de PCR utilizando os *primers* *glnE-conf\_fwd* e *glnE-DOWN\_rev*, que são complementares a uma região externa ao gene e visando detectar as cópias selvagem (3205 pb) e deletada (1843 pb). As etapas seguintes para obtenção de duplo recombinantes foram feitas como descrito no item 4.9.1, e a seleção de mutantes duplos foi feita tanto por reação de PCR, visando detectar somente a cópia deletada do gene, quanto por análise de sequenciamento para confirmar a deleção somente da porção desejada *in frame* (usando os mesmos *primers* supramencionados). A estirpe mutante construída foi denominada FP2 $\Delta$ *NglnE*, e continha deleção cromossômica da região 5' de *glnE*, que codificava para uma proteína truncada nos 454 resíduos de aminoácidos iniciais.

### 5.6.3 Construção de plasmídeo mutagênico para inserção de mutações pontuais em *glnD*

Tendo em vista que GlnD parece ser o sensor primário do *status* de nitrogênio na célula por meio da detecção dos níveis de glutamina, esse estudo teve como objetivo mutagenizar o domínio responsável pela atividade removedora de grupos uridilil (UR), de forma a obter-se PII sempre em sua forma uridililada. Para isso, a estratégia empregada foi baseada na mutagênese dos resíduos de histidina e aspartato conservados no domínio HD de GlnD (H552A e D553A em *A. brasilense*), os quais foram mostrados ser essenciais para a atividade UR (H514 e D515 em *E. coli*) (ZHANG *et al.*, 2010).

A construção do plasmídeo mutagênico foi feita por meio da amplificação de *glnD* em dois fragmentos separados a partir do DNA genômico da estirpe FP2, utilizando dois pares de *primers* mutagênicos (*glnD-UP\_fwd/glnD-UP\_rev* e *glnD-DOWN\_fwd/glnD-DOWN\_rev*), gerando um fragmento UP (1690 pb) e um fragmento DOWN (1174 pb) (seção 4.9.2.2). Além das duas mutações pontuais mencionadas acima, durante as reações de amplificação também foi feita a alteração da base C1674 (C $\rightarrow$ G) participante de um sítio de restrição para a enzima *SacII* (localizado próximo aos códons dos resíduos H552 e H553), utilizando os *primers* pK18-

*glnD*\_fwd e pK18-*glnD*\_rev. A substituição C1674G de *glnD* permitiu a destruição do sítio *SacII*, sem alterar o resíduo de aminoácido codificado (R558→R558) (seção 4.9.2.2). Essa estratégia foi adotada com o intuito de facilitar as etapas de confirmação de mutantes simples e duplos, uma vez que as mutações pontuais inseridas não alterariam o tamanho do gene *glnD*. Os produtos de amplificação foram ligados ao vetor pK18mobsacB linearizado no sítio *SmaI*, utilizando a técnica de Gibson Assembly (seção 4.5.8.1). O plasmídeo resultante, denominado pTMA2602, foi confirmado por meio da amplificação do inserto clonado (2842 pb) e posterior digestão do produto com a enzima de restrição *SacII*, que gerou os fragmentos teóricos esperados de 1772 pb, 602 pb e 468 pb. Adicionalmente, a sequência adicionada ao vetor foi confirmada por reação de sequenciamento utilizando os *primers* *glnD*-UP\_fwd e *glnD*-conf\_fwd.

#### 5.6.4 Construção de mutantes contendo mutações pontuais em *glnD* no genoma

Após as etapas de confirmação, o plasmídeo mutagênico pTMA2602 foi transformado em *E. coli* S17.1 e transferido para *A. brasilense* FP2 e FP2Δ*NglnE* utilizando a técnica de conjugação biparental (seção 4.8). A confirmação de recombinantes simples foi feita por meio da amplificação da região que compreende o gene *glnD* utilizando os *primers* *glnD*-conf\_fwd e *glnD*-DOWN\_rev e a posterior digestão do produto com a enzima *SacII*, gerando os seguintes fragmentos teóricos esperados: 1226 pb, 602 pb, 546 pb e 468 pb, referentes à cópia selvagem e; 1772 pb, 602 pb e 468 pb, referentes à cópia contendo as mutações pontuais (total de quatro bandas visualizadas no gel).

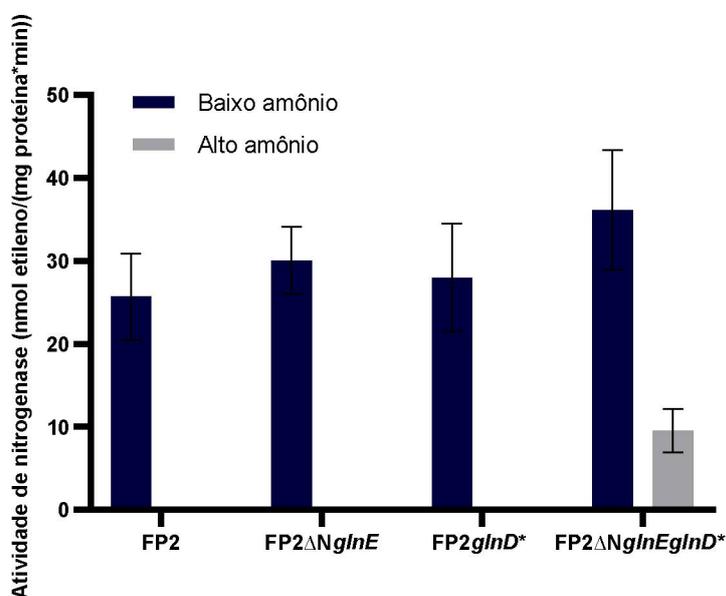
As etapas seguintes para obtenção de recombinantes duplos foram feitas como descrito no item 4.9.1, e a seleção de mutantes foi feita tanto por reação de PCR e digestão com *SacII*, (visando detectar somente as três bandas características da cópia contendo mutações pontuais), quanto por análise de sequenciamento (usando os mesmos *primers* supramencionados). As estirpes mutantes construídas foram denominadas FP2*glnD*\* (contendo as substituições H552A e D553A em GlnD) e FP2Δ*NglnEglnD*\* (contendo deleção de 454 resíduos do domínio N-terminal GlnE combinada às substituições H552A e D553A em GlnD).

#### 5.6.5 Caracterização de mutantes contendo mutagênese de GlnE e/ou GlnD

Após a confirmação da identidade dos mutantes construídos, foram iniciados os ensaios de caracterização bioquímica e fisiológica. Inicialmente, foi avaliado o perfil de atividade da nitrogenase através de ensaio de redução do acetileno, como descrito na seção 4.11.1. Para isso, as estirpes foram cultivadas em meio NFbHP-lactato semi-sólido em condições de baixo (0,5

mM de glutamato) e alto (10 mM NH<sub>4</sub>Cl) nitrogênio. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 47.

**Figura 47 - Determinação de atividade da nitrogenase das estirpes mutantes nos genes *glnE* e *glnD***



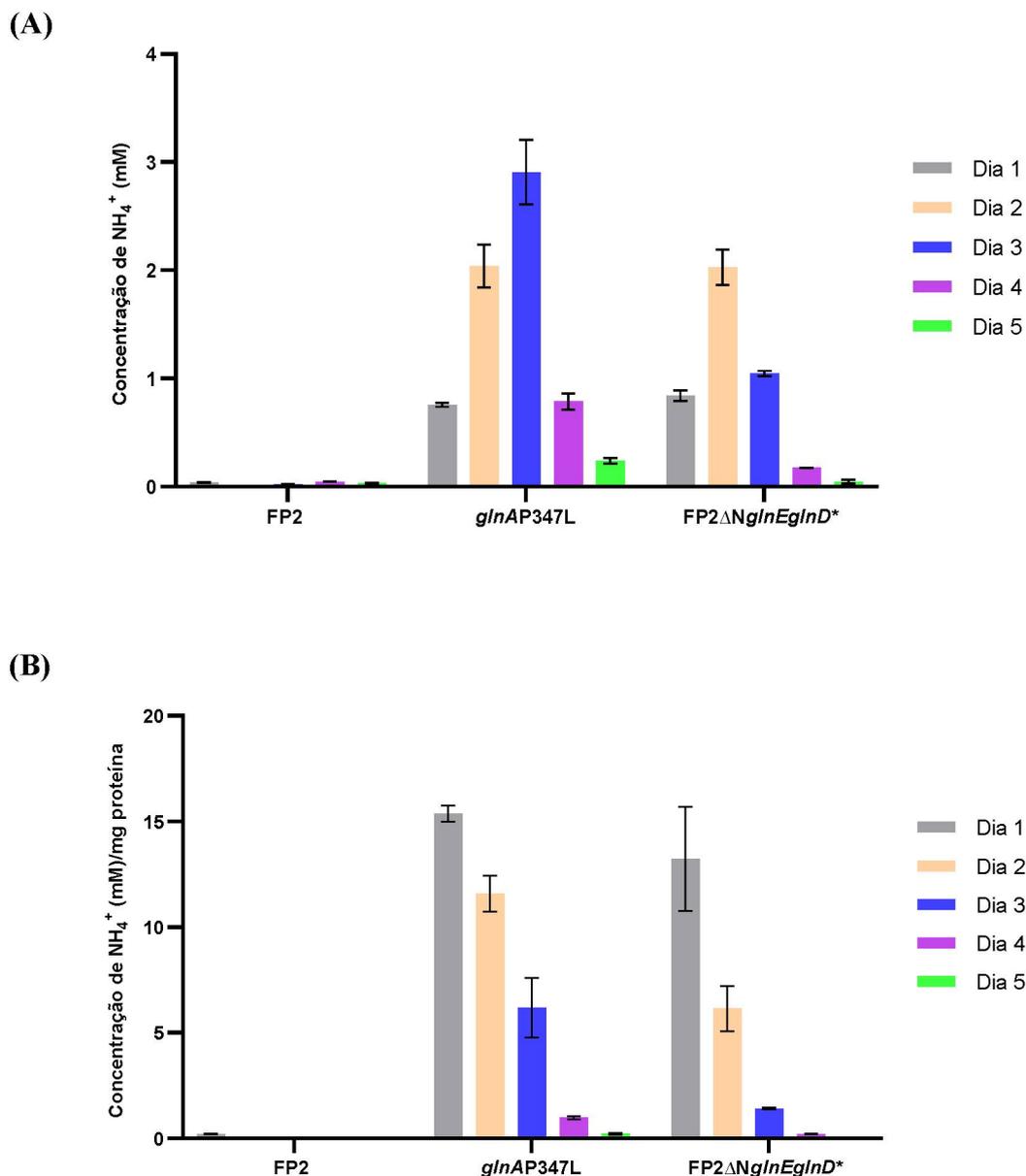
Isolados das estirpes mutantes FP2Δ*glnE*, FP2*glnD*\* e FP2Δ*glnEglnD*\* foram cultivados para ensaio de atividade de nitrogenase. A estirpe FP2 de *A. brasilense* também foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio), utilizando o método de redução de acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata biológica.

De acordo com a Figura 47 é possível observar que as mutações em *glnE* ou *glnD* avaliadas isoladamente resultaram em estirpes com fenótipos de fixação de nitrogênio similares ao da estirpe selvagem, embora a diferença observada entre FP2 e FP2Δ*glnE* tenha sido significativa ( $p=0,0316$ ). Por outro lado, a combinação de ambas as mutações gerou uma estirpe capaz de fixar nitrogênio mesmo na presença de altas concentrações de amônio, e com atividade de nitrogenase aumentada em baixa concentração de amônio ( $p=0,0241$ ). Esse resultado sugere que o mutante duplo FP2Δ*glnEglnD*\* apresenta perda de um ou mais pontos de controle da integração de sinais metabólicos, e que a atividade da glutamina sintetase provavelmente tenha sido alterada. Por outro lado, é válido ressaltar que, embora o mutante duplo apresente nitrogenase ativa em condições de excesso de nitrogênio, ainda há um controle parcial de componentes relacionados à regulação transcricional e/ou pós-traducional da FBN.

Numa próxima etapa foi avaliada a capacidade do mutante FP2Δ*glnEglnD*\* de excretar amônio. Para isso, inicialmente foi realizado o cultivo da estirpe em meio NFbHP-

lactato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamina, e dosagens de amônio excretado foram feitas por um período de 5 dias, utilizando o método do indofenol (seção 4.12). As estirpes FP2 e *glnAP347L* foram avaliadas conjuntamente, e o resultado obtido das quantificações é mostrado na Figura 48.

**Figura 48 - Ensaio de quantificação de amônio excretado pelo mutante *FP2ΔNglEglnD\****



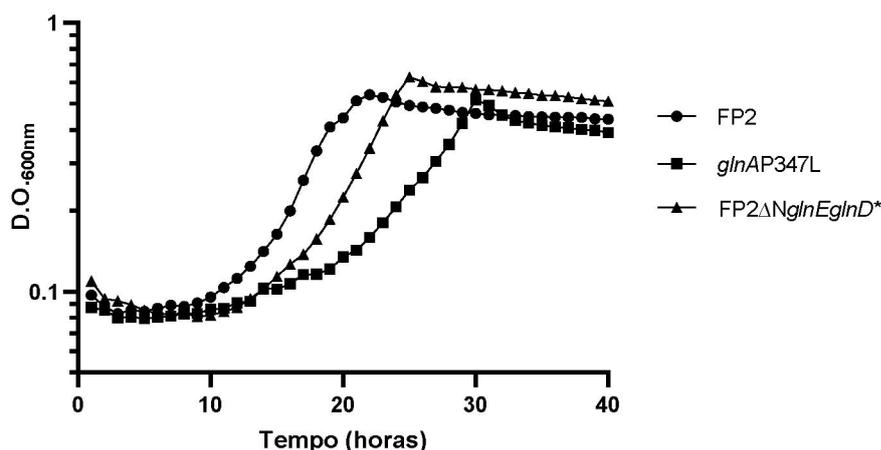
Isolados da estirpe mutante *FP2ΔNglEglnD\** foram submetidos ao ensaio quantificação de amônio. A estirpe parental FP2 e a estirpe excretora de amônio *glnAP347L* de *A. brasilense* foram adicionadas como controles experimentais. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamina. As dosagens de amônio a partir das culturas foram feitas por um período de 5 dias consecutivos utilizando o método do indofenol. As concentrações obtidas foram expressas em milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado (A) e milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado/mg proteína total da cultura (B). Nos gráficos estão indicados os desvios-padrão em torno da média de ao menos três experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

Os resultados das quantificações apresentados na Figura 48 mostram que, além de fixar nitrogênio em condições de suficiência de nitrogênio, o mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\* é capaz de excretar amônio para o meio em concentrações milimolares (48A). Esse resultado é consistente com a hipótese inicial de que a desintegração de sinais metabólicos por meio da alteração das atividades UR e AR das proteínas bifuncionais GlnD e GlnE, respectivamente, leva ao desacoplamento dos processos de fixação e assimilação de amônio. Assim como discutido anteriormente para os mutantes pontuais de *glnA*, é possível que as mutações combinadas reduzam a atividade de GS, resultando em acúmulo e, conseqüentemente, excreção de amônio para o meio. Entretanto, é válido ressaltar que o mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\* apresenta níveis de excreção inferiores ao da estirpe *glnAP347L*, o que é consistente com os dados de atividade de nitrogenase, embora esta diferença não seja muito evidente durante o primeiro dia de dosagem no dado normalizado pelo conteúdo proteico total da cultura (48B). É possível que uma fração do amônio produzido seja sendo incorporado pelas vias de assimilação devido a ausência de inativação total de GS no mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\*.

Interessantemente, as estirpes FP2 $\Delta$ *NglnE* e FP2 $\Delta$ *glnD*\* avaliadas individualmente, mostraram ser incapazes de gerar excreção de amônio para o meio (dado não mostrado). Estudos recentes realizados por Schnabel e Sattely (2021) mostraram que a expressão plasmidial de uma variante de GlnE de *A. brasilense* truncada nos 448 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal em um mutante  $\Delta$ *glnE* não gerou excreção de amônio, provavelmente devido a um grau insuficiente de adenililação dos monômeros de GS (em torno de 9 sítios adenililados do total de 12). Essas observações são condizentes com os dados obtidos para a variante de GlnE produzida nesse estudo, a qual foi truncada em um ponto próximo (454 resíduos deletados). Por outro lado, Schnabel e Sattely (2021) também demonstraram que a expressão plasmidial de uma outra variante de GlnE deletada nos 505 resíduos de aminoácidos da porção 5' em mutante  $\Delta$ *glnE*, foi capaz de gerar excreção de amônio a níveis milimolares, sugerindo que a variante truncada seja menos responsiva à presença de PII ou PII-UMP (SCHNABEL e SATTELY, 2021).

Com o intuito de avaliar o perfil de crescimento do mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\*, foi realizado o cultivo em meio NFbHPN-lactato utilizando leitor de microplaca de parâmetros controláveis, conforme descrito na seção de materiais e métodos (seção 4.3.4). Para esse experimento foram adicionadas como controles as estirpes FP2 e *glnAP347L*. O resultado é mostrado na Figura 49.

**Figura 49 - Perfil de crescimento do mutante *FP2ΔNglN<sub>EglnD</sub>\** relativo às estirpes FP2 e *glnAP347L***



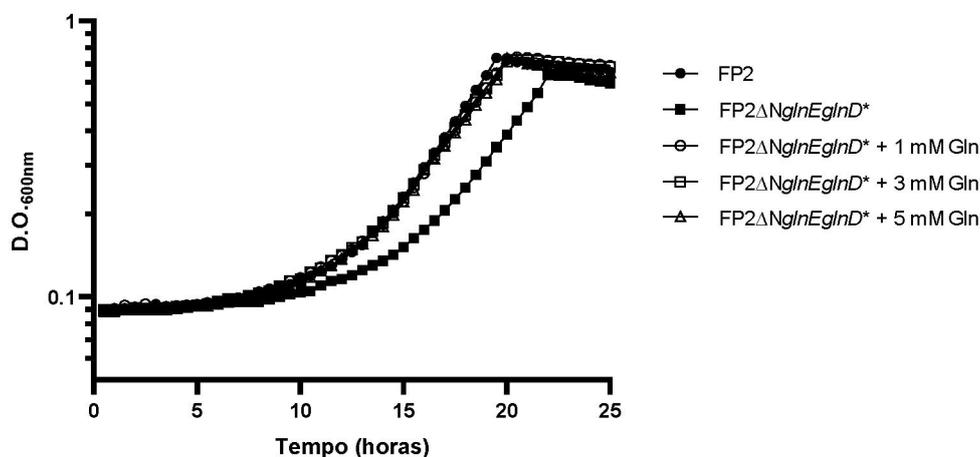
As estirpes FP2, *glnAP347L* e *FP2ΔNglN<sub>EglnD</sub>\** foram cultivadas em microplaca contendo 500  $\mu$ L de meio NFbHP-lactato líquido (20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio) a 28°C. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm usando leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento das estirpes a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

A partir da Figura 49 é possível concluir que o mutante duplo (tl  $\cong$  14,0 horas; td  $\cong$  3.5 horas), apresenta um perfil de crescimento mais lento em relação à estirpe selvagem (tl  $\cong$  12,0 horas,  $p < 0,05$ ; td  $\cong$  3,1 horas), o que era esperado, visto que há uma demanda energética superior para o fenótipo de fixação de nitrogênio na presença de amônio observado no mutante. O déficit no crescimento de *FP2ΔNglN<sub>EglnD</sub>\**, porém, parece ser inferior ao da estirpe *glnAP347L* (tl  $\cong$  18,0 horas; td  $\cong$  5,2 horas,  $p < 0,05$ ), a qual atinge o final da fase exponencial somente após cerca de 30 horas de cultivo; isto condiz bem com as atividades de nitrogenase observadas em presença de amônio para as duas estirpes, que foi maior em *glnAP347L* ( $\sim 20 \text{ nmol/mg/min}$ ) do que em *FP2ΔNglN<sub>EglnD</sub>\** ( $\sim 10 \text{ nmol/mg/min}$ ), caso o déficit de crescimento esteja sendo causado pela perda de energia com fixação desnecessária de nitrogênio. Uma outra possibilidade é que a relação causa-efeito seja outra: o mutante *FP2ΔNglN<sub>EglnD</sub>\** fixa menos nitrogênio em alto amônio porque possui menor deficiência na assimilação de amônio a glutamina e, portanto, menor sinalização de carência de nitrogênio repassada para GlnB/NifA.

Com o intuito de avaliar a dependência de *FP2ΔNglN<sub>EglnD</sub>\** de suplementação de glutamina para recuperar o fenótipo de crescimento da estirpe selvagem, o experimento foi repetido com a adição de diferentes concentrações de glutamina ao meio NFbHPN-lactato. O monitoramento do crescimento foi feito utilizando um leitor de microplaca de parâmetros

controláveis, de forma análoga à descrita anteriormente. O resultado desse experimento é mostrado na Figura 50.

**Figura 50 - Efeito da adição de glutamina no perfil de crescimento do mutante FP2 $\Delta$ NglEglnD\***



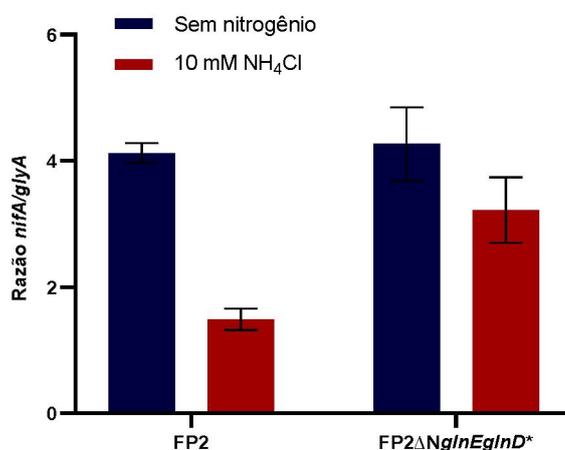
As estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ NglEglnD\* foram cultivadas em microplaca contendo 500  $\mu$ L de meio NFbHP-lactato líquido (20 mM de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio) a 28°C. Adicionalmente, diferentes concentrações de glutamina foram suplementadas ao meio a fim de verificar alteração no perfil de crescimento do mutante. O monitoramento das culturas foi feito através da determinação de densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm, usando leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

É possível observar que o mutante FP2 $\Delta$ NglEglnD\* é menos dependente de suplementação por glutamina quando comparado à estirpe *glnAP347L* (ver Figura 33); a adição de 1 mM de glutamina mostrou ser suficiente para recuperar o fenótipo de crescimento da estirpe selvagem (tl  $\cong$  11,0 horas; td  $\cong$  3,0 horas), pelo mutante (tl  $\cong$  11,0 horas; td  $\cong$  3,2 horas,  $p > 0,05$ ). Esse resultado correlaciona com os dados dos experimentos de atividade de nitrogenase e excreção de amônio, e aponta para uma estirpe possivelmente menos deficiente na biossíntese intracelular de glutamina e, conseqüentemente, com melhor *fitness* em relação ao mutante em *glnA*, o que poderia ser vantajoso em termos de performance em campo com biofertilizante nitrogenado e promotor do crescimento vegetal.

Na etapa seguinte da caracterização, foram analisados os níveis de expressão de *nifA* no mutante FP2 $\Delta$ NglEglnD\*, com o intuito de investigar a nível transcricional o fenótipo de fixação constitutiva de nitrogênio e excreção de amônio. Para isso, colônias isoladas foram inoculadas em meio NFbHP-lactato líquido e cultivadas na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl, em condições pré-estabelecidas (seção 4.6.1). Em seguida, foi feita a quantificação de transcritos de *nifA* por meio da técnica de RT-qPCR (*primers* nifA-

RTqPCR1\_fwd/nifA-RTqPCR1\_rev e glyA-RTqPCR1\_fwd e glyA-RTqPCR1\_rev), conforme descrito no item 4.6.3. O resultado é mostrado na Figura 51 abaixo:

**Figura 51 - Avaliação dos níveis de expressão de *nifA* a partir da estirpe FP2 $\Delta$ NglEglnD\* cultivada na ausência ou presença de amônio**



As análises de RT-qPCR foram realizadas conforme descrito na seção de material e métodos, utilizando as estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ NglEglnD\*, as quais foram cultivadas em meio NFbHP-lactato na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl. A determinação dos níveis de transcritos de *nifA* foi feita por meio de quantificação relativa usando o gene *glyA* como referência. As barras de erro representam os desvios-padrão de um experimento realizado em duplicata biológica.

As reações de qPCR mostraram repressão parcial do promotor de *nifA* na estirpe selvagem em resposta a altos níveis de amônio, também em torno de duas vezes e meia, confirmando dados obtidos anteriormente (ver Figura 40). Por outro lado, assim como observado para as estirpes mutantes contendo a substituição P347L de GS, o mutante duplo nos genes *glnE* e *glnD* exibiu níveis superiores de transcritos de *nifA* quando cultivado em condições de suficiência de nitrogênio em comparação com a estirpe FP2. Esse resultado auxilia na explicação do fenótipo observado nos experimentos de determinação de atividade de nitrogenase e excreção de amônio: a presença de mais NifA no citoplasma implica em mais transcrição dos genes *nif*, como já observado nos experimentos de complementação do mutante FP2 $\Delta$ *nifA* por NifA expressa a partir de plasmídeos. Aliado à possível presença de GlnB-UMP mesmo em condições alto amônio e à presumida disponibilidade de 2OG nas mesmas condições, tem-se mais NifA com parceiros de ativação disponíveis em FP2 $\Delta$ NglEglnD\* do que na estirpe selvagem, com consequente expressão e atividade da nitrogenase na presença de amônio.

## **5.7 Avaliação do efeito da adição de mutações ativadoras de NifA no mutante FP2ΔN*glnEglnD*\***

### **5.7.1 Construção da estirpe mutante tripla contendo mutação nos genes *glnE*, *glnD* e *nifA* de *A. brasilense***

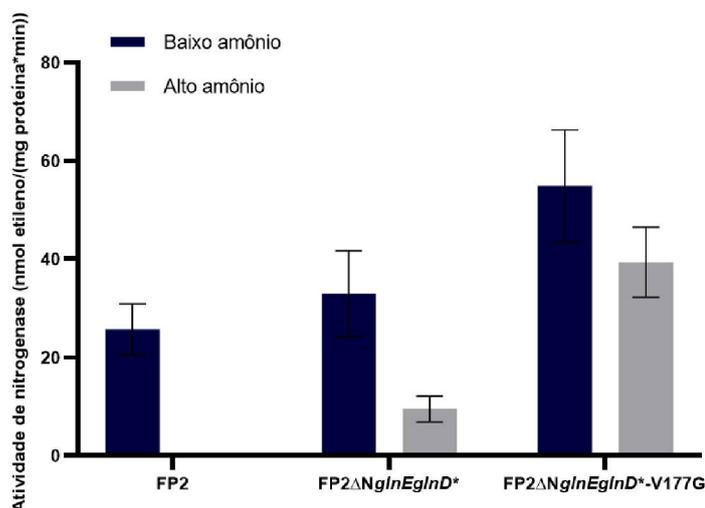
Considerando os ensaios de caracterização das variantes pontuais de NifA expressas a partir de plasmídeo e do genoma (seções 5.2.2, 5.2.3 e 5.2.4.1), o efeito positivo da transferência de duas dessas mutações para o genoma da estirpe *glnAP347L* (seção 5.5), e a expressão constitutiva do gene *nifA* na estirpe FP2ΔN*glnEglnD*\* (seção 5.6.5), decidiu-se por construir um mutante triplo contendo mutações nos genes *glnE*, *glnD* e *nifA*.

Para a construção do mutante triplo, foi selecionada a substituição V177G de NifA, que pareceu a mais promissora ao levar em consideração os dados previamente obtidos neste estudo. Para facilitar a seleção de recombinantes simples e duplos, inicialmente foi feita deleção completa do gene *nifA* na estirpe FP2ΔN*glnEglnD*\* utilizando o plasmídeo mutagênico pTMA2003, de forma análoga à descrita nas seções 5.2.4.1 e 5.5.1. Em seguida, a estirpe construída, denominada FP2ΔN*glnEglnD*Δ*nifA*, foi usada como recipiente para o plasmídeo mutagênico pTMA2405, transferido por conjugação biparental, a fim de restituir o gene *nifA* com a alteração T530G, que gera a substituição V177G. A confirmação de simples e duplos recombinantes foi feita por reações de PCR e sequenciamento, de forma análoga à descrita nas seções 5.2.4.1 e 5.5.1. A estirpe mutante construída foi denominada FP2ΔN*glnEglnD*\*-V177G-NifA e continha deleção de 454 resíduos de aminoácidos da porção 5' de GlnE, as mutações pontuais H552A e D553A de GlnD e a mutação pontual V177G de NifA.

### **5.7.2 Caracterização de mutante triplo contendo mutagênese de GlnE, GlnD e NifA**

Após as etapas de confirmação da identidade do mutante construído, foram iniciados os ensaios de caracterização bioquímica e fisiológica. Inicialmente, foi determinada a atividade da nitrogenase por meio do método de redução do acetileno (seção 4.11.1). Para isso, isolados da estirpe FP2ΔN*glnEglnD*\*-V177G-NifA foram cultivados em meio NFbHP-lactato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamina (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio). Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 52 abaixo.

**Figura 52 - Perfil de atividade da nitrogenase do mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA em condições de baixo e alto amônio**



Isolados da estirpe mutante tripla FP2ΔNglEglnD\*-V177G-NifA foram cultivados para ensaio de atividade de nitrogenase. As estirpes selvagem FP2 e excretora de amônio FP2ΔNglEglnD\* também foram adicionadas como controles experimentais. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamina (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl (condição de alto amônio), utilizando o método de redução de acetileno, conforme descrito em materiais e métodos (seção 4.11.1). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios-padrão em torno da média de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata biológica.

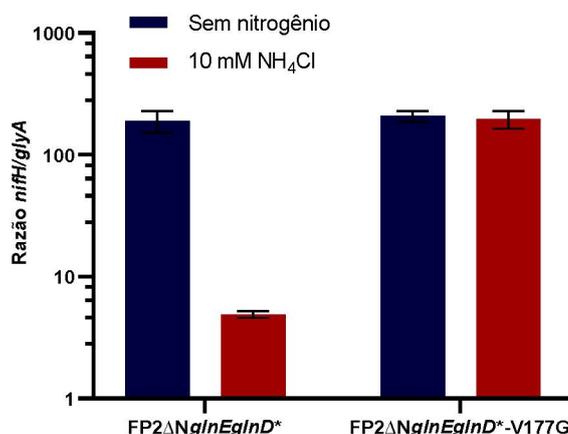
O gráfico permite concluir que a adição da mutação V177G de NifA ao mutante FP2ΔNglEglnD\* gerou uma estirpe mais eficiente na fixação de nitrogênio, já que a atividades específicas da nitrogenase obtidas na presença de altos níveis de amônio foram significativamente maiores quando comparadas à estirpe parental FP2ΔNglEglnD\* ( $p < 0,001$ ). Esse resultado reitera a evidência de um menor controle do promotor de *nifA*, e que a mutação pontual V177G gera uma proteína NifA menos responsiva ao *status* de nitrogênio intracelular.

Além disso, esses dados confrontam a hipótese levantada em estudo anterior de que o desacoplamento da sinalização pelo indicador central do *status* de nitrogênio, como resultado do desligamento de GS induzido por alteração da atividade AR de GlnE, é suficiente para que a capacidade de fixação de nitrogênio nativa seja maximizada em *A. brasilense* (SCHNABEL e SATTELY, 2021). De fato, no presente estudo é sugerido que maximização de atividade da nitrogenase requer que o regulador central da transcrição dos genes *nif* (NifA) não tenha sua expressão e atividade regulados negativamente por amônio, regulação esta que parece estar ocorrendo no duplo mutante FP2ΔNglEglnD\* e que explicaria sua menor capacidade de fixar nitrogênio quando comparado com seu derivado.

Com o intuito de verificar se a maior taxa de fixação de nitrogênio no mutante triplo poderia ser explicada pelos níveis de transcritos de *nifH*, este foi cultivado em meio NFbHP-lactato na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl, nas condições descritas em

4.6.1. As culturas foram utilizadas para extração de RNA total, síntese de cDNA, e quantificação de transcritos de *nifH* através da técnica de RT-qPCR, utilizando os *primers* nifH-RTqPCR1\_fwd/nifH-RTqPCR1\_rev e glyA-RTqPCR1\_fwd e glyA-RTqPCR1\_rev, conforme descrito em detalhes na seção 4.6.1. O resultado da quantificação relativa de transcritos é mostrado na Figura 53 abaixo.

**Figura 53 - Avaliação dos níveis de expressão de *nifH* no mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA cultivado na ausência ou presença de amônio**



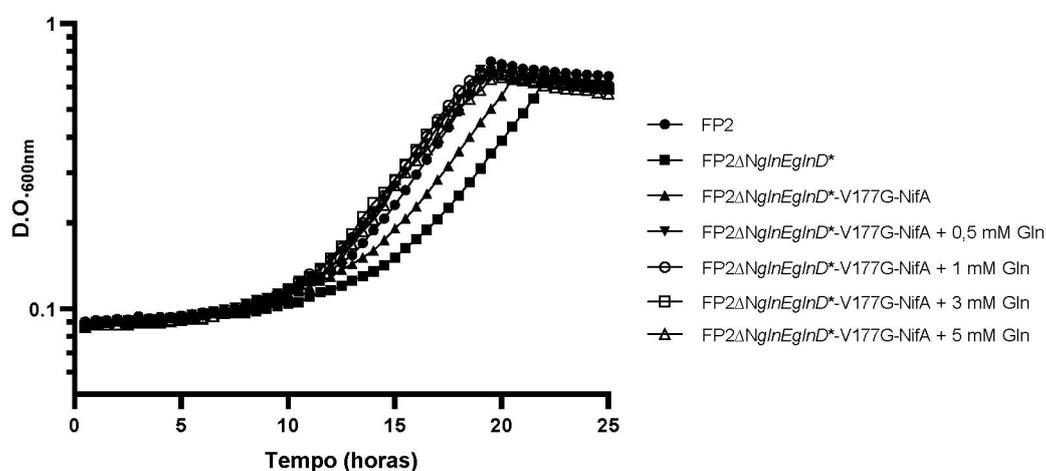
As análises de RT-qPCR foram realizadas conforme descrito na seção de material e métodos usando as estirpes FP2ΔNgnEglnD\* e FP2ΔNgnEglnD\*-V177G-NifA, as quais foram cultivadas em meio NFbHP-lactato na ausência de amônio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl. A determinação dos níveis de transcritos de *nifH* foi feita por meio de quantificação relativa usando o gene *glyA* como referência. As barras de erro representam os desvios-padrão de um experimento realizado em duplicata biológica.

A expressão de *nifH* nas estirpes testadas seguiu o padrão esperado: no mutante FP2ΔNgnEglnD\* foi possível detectar a presença de transcritos em condições de altos níveis de amônio, o que não ocorre na estirpe selvagem (Figura 42). Além disso, as reações de PCR quantitativas revelaram uma quantidade semelhante de transcritos de *nifH* observada para o mutante triplo em ambas as condições testadas ( $p=0,49$ ), indicando ausência de regulação do promotor desse gene. Esse resultado é condizente com os dados de atividade de nitrogenase apresentados na Figura 52, que mostram ausência de controle da nitrogenase do mutante em condições de suficiência de nitrogênio. Além disso, os dados de análise transcricional nos mutantes FP2ΔNgnEglnD\*-V177G-nifA e *glnAP347L-V177G-NifA* mostram grande similaridade, sustentando o modelo de ausência de modulação da atividade de NifA contendo a substituição V177G em resposta a disponibilidade de nitrogênio e PII em *A. brasilense* (ver seções 5.2.2 e 5.2.3).

O experimento seguinte realizado foi a avaliação do perfil de crescimento do mutante triplo em meio líquido. Para isso, a estirpe foi cultivada em meio NFbHPN-lactato utilizando leitor de microplaca de parâmetros controláveis, conforme descrito na seção de materiais e

métodos (seção 4.3.4). Com o intuito de estudar seu efeito na taxa de crescimento, foi feita a suplementação com diferentes concentrações de glutamina. Como controles experimentais, foram adicionadas à mesma placa as estirpes selvagem FP2 e parental FP2 $\Delta$ NgnEglnD\*. O resultado do monitoramento do cultivo é mostrado na Figura 54.

**Figura 54 - Perfil de crescimento do mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA relativo às estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ NgnEglnD\***



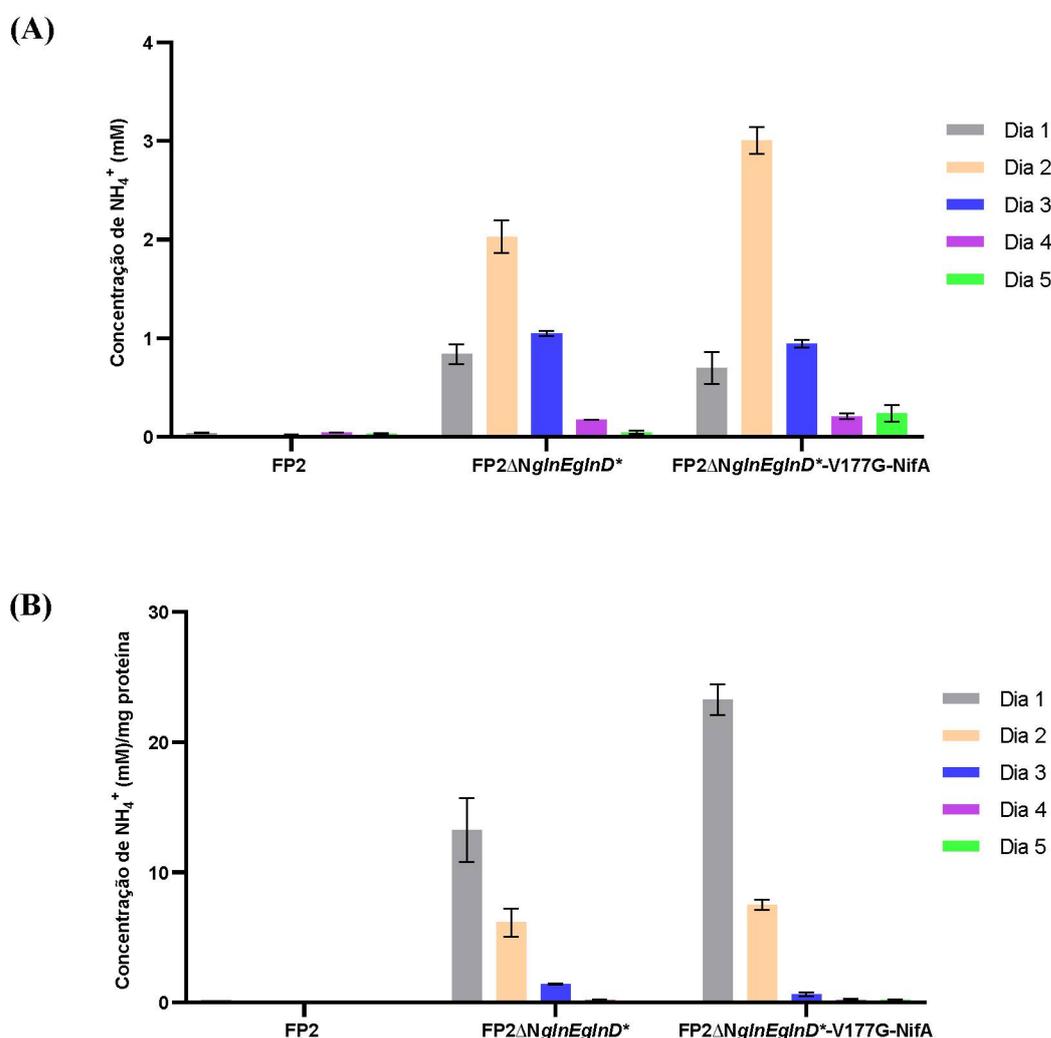
As estirpes FP2, FP2 $\Delta$ NgnEglnD\* e FP2 $\Delta$ NgnEglnD\*-V177G-NifA foram cultivadas em microplaca contendo 500  $\mu$ L de meio NFbHP-lactato (20 mM de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio) a 28°C. Adicionalmente, diferentes concentrações de glutamina foram suplementadas ao meio a fim de verificar alteração no perfil de crescimento do mutante triplo. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm usando leitor de microplaca de parâmetros controláveis Tecan Infinite M200. O gráfico, em escala logarítmica, demonstra o perfil de crescimento das estirpes a partir de um experimento representativo realizado em duplicata biológica. Os parâmetros de duração de fase lag (tl) e tempo de duplicação (td) foram extraídos das curvas, conforme descrito em materiais e métodos.

De acordo com a Figura 54, é possível concluir que o mutante triplo apresenta um déficit de crescimento inferior (tl  $\cong$  12,5 horas; td  $\cong$  3,0 horas), quando comparado a sua estirpe parental FP2 $\Delta$ NgnEglnD\* (tl  $\cong$  14,5 horas,  $p < 0,05$ ; td  $\cong$  3,2 horas) e cultivado na ausência de qualquer fonte de glutamina. Esse resultado poderia ser justificado pela maior taxa de fixação de nitrogênio no mutante triplo, o que resultaria em um crescimento mais rápido, tal como discutido quando da introdução desta mesma mutação de NifA no mutante *glnAP347L*. Além disso, a adição de 0,5 mM de glutamina mostrou ser suficiente para recuperar o fenótipo de crescimento da estirpe selvagem (tl  $\cong$  11,0 horas; td  $\cong$  3,0 horas) pelo mutante triplo (tl  $\cong$  9,5 horas; td  $\cong$  3,3 horas,  $p > 0,05$ ), sugerindo uma menor dependência à suplementação com glutamina quando comparado à estirpe *glnAP347L*.

Visando investigar se o aumento nas taxas de crescimento e fixação de nitrogênio observadas no mutante triplo eram acompanhadas por uma maior eficiência de excreção de amônio, colônias isoladas foram cultivadas em meio NFbHP-lactato semi-sólido na presença

de 0,5 mM de glutamina. O monitoramento do perfil de excreção foi realizado por um período de 5 dias utilizando o método do indofenol, conforme descrito na seção 4.12. Os resultados das quantificações de  $\text{NH}_4^+$  são mostrados na Figura 55.

**Figura 55 - Ensaio de quantificação de amônio excretado pelo mutante triplo de GlnE, GlnD e NifA**



Isolados da estirpe mutante *FP2ΔNgnEglnD\*-V177G-NifA* foram submetidos ao ensaio de quantificação de amônio. A estirpe parental FP2 e a estirpe excretora de amônio *FP2ΔNgnEglnD\** de *A. brasilense* foram adicionadas como controles experimentais. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamina. As dosagens de amônio a partir das culturas foram feitas por um período de 5 dias consecutivos, utilizando o método do indofenol. As concentrações obtidas foram expressas em milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado (A) e milimol de  $\text{NH}_4^+$  excretado/mg proteína total da cultura (B). Nos gráficos estão indicados os desvios-padrão em torno da média de dois experimentos representativos realizados em duplicata biológica.

Os resultados dos ensaios de excreção de amônio mostram que a adição da mutação V177G de NifA à estirpe *FP2ΔNgnEglnD\** gera uma estirpe mais eficiente na excreção de amônio (55A e B). Esse fenótipo pode ser justificado pelas altas taxas de fixação de nitrogênio, que levam a uma maior produção e, conseqüentemente, excreção de amônio. Além disso, é

possível observar que o pico de excreção pelo mutante triplo é comparável ao da estirpe *glnAP347L* (Figura 48). Entretanto, é válido ressaltar que os níveis totais de amônio excretado pelas estirpes construídas parecem não exceder a marcar de 4 mM, o que é condizente com dados disponíveis na literatura (MACHADO *et al.*, 1991, SCHNABEL e SATTELY, 2021). Uma possível justificativa para esse fenótipo seria o esgotamento da fonte de carbono após cultivo prolongado, e depleção do metabolismo energético.

### 5.8 Avaliação de atividade da glutamina sintetase (GS) dos mutantes construídos

Os ensaios de caracterização das estirpes construídas neste estudo sugerem que um dos mecanismos possíveis para a obtenção de excreção de amônio consiste na redução da atividade biossintética da enzima glutamina sintetase. O efeito da substituição P347L em GS é facilmente associado a este mecanismo, e o efeito da alteração introduzida em GlnE também precisa, logicamente, ser relacionado à influência da proteína GlnE alterada sobre seu único alvo conhecido, que é a enzima GS. No entanto, o efeito da alteração operada em GlnD é potencialmente mais pleiotrópico, pois ao afetar o estado de uridililação das proteínas PII pode indiretamente ter efeito sobre a atividade de NifA, de NtrC, da transcrição de GS, e da atividade de GlnE; os ensaios realizados até aqui não permitem discernir o quanto do fenótipo observado nos mutantes FP2*glnD*\* e FP2Δ*NglnEglnD*\* seria devido à influência indireta dessas mutações sobre GS, e quanto seria causado por outros mecanismos.

A fim de entender melhor o efeito das mutações introduzidas sobre a atividade de GS, foram realizados ensaios *in vitro* de atividade de glutamina sintetase a partir de culturas de *A. brasilense* cultivadas em meio NFbHP-lactato líquido sob condições de fixação ou suficiência de nitrogênio, como detalhado na seção 4.11.3.1. Permeabilizados celulares das estirpes de interesse foram utilizados para medição da atividade transferásica de GS (GST), conforme descrito em 4.11.3.3. Nessa reação é avaliada a atividade reversa de GS, que produz  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato e amônia a partir da incubação da enzima na presença de glutamina e hidroxilamina. Os resultados foram expressos em nmol de LGH formado por miligrama de proteína total por minuto e são apresentados na Tabela 13. Para esses ensaios, os sistemas de reação foram preparados na presença ou ausência de  $Mg^{2+}$ , que, nas condições do ensaio, atua como inibidor da atividade de GS adenililada; portanto, as atividades obtidas referem-se à GS não adenililada ou total (formas adenililada e não-adenililada), respectivamente.

Tabela 13 - Atividade transferásica da GS de estirpes mutantes de *A. brasilense*

Estirpe	Fonte de nitrogênio	Atividade Transferásica		
		-Mg <sup>2+</sup>	+Mg <sup>2+</sup>	% GS não adenililada
FP2	Sem nitrogênio	1369 (89)	996 (63)	73
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	711 (67)	148 (26)	21
HM053	Sem nitrogênio	361 (19)	93 (12)	26
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	154 (27)	29 (5)	19
<i>glnAP347L</i>	Sem nitrogênio	338 (62)	86 (6)	25
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	131 (29)	21 (8)	16
<i>glnAP347L-M185P-NifA</i>	Sem nitrogênio	260 (125)	54 (28)	21
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	89 (13)	14 (2)	15
FP2ΔN- <i>glnE</i>	Sem nitrogênio	1328 (75)	1062 (15)	80
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	499 (27)	354 (20)	71
FP2 <i>glnD</i> *	Sem nitrogênio	1450 (66)	547 (38)	38
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	785 (63)	146 (11)	19
FP2ΔN <i>glnEglnD</i> *	Sem nitrogênio	6 (1)	23 (0,7)	372
	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	18 (4)	97 (0,4)	533
FP2ΔN <i>glnEglnD</i> *-	Sem nitrogênio	11 (4)	18 (0,1)	157
V177G-NifA	10 mM NH <sub>4</sub> Cl	15 (0,9)	79 (7)	523

A atividade transferásica de GS (GST) foi determinada a partir de permeabilizados celulares, conforme descrito em materiais e métodos. Para isso, as estirpes foram cultivadas em meio NFbHP-lactato líquido na ausência de nitrogênio ou na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl em frascos contendo 6% de oxigênio na fase gasosa. Os cálculos foram feitos a partir da leitura de absorbância do produto  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato formado a 540 nm em leitor de microplaca CLARIOstar (BMG Labtech). Os resultados foram expressos em nmol de LGH formado por miligrama de proteína total por minuto. Na tabela estão indicados os desvios-padrão (em parênteses) em torno da média de ao menos dois experimentos realizados em triplicatas biológicas.

Os dados compilados na Tabela 13 mostram uma redução de cerca de duas vezes na atividade transferásica de GS total (-Mg<sup>2+</sup>) da estirpe FP2 quando cultivada na presença de alto amônio em relação à condição sem nitrogênio, e cerca de seis vezes para GS não adenililada (+Mg<sup>2+</sup>). Além disso, a atividade de GS não modificada mostrou ser quase uma vez e meia e cinco vezes menor do que a atividade de GS total (-Mg<sup>2+</sup>) quando a estirpe selvagem foi

cultivada na ausência de amônio ou com 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente. Esses resultados são condizentes com dados prévios reportados por Machado e colaboradores (1991), apesar de os níveis de atividade total do presente estudo terem sido inferiores aos reportados no estudo anterior.

Em relação aos mutantes de *glnA*, foi observado uma atividade GST total da estirpe HM053 em torno de quatro vezes inferior em relação à estirpe selvagem nas duas condições de cultivo testadas, e uma atividade transferásica de GS não adenililada cerca de dez vezes inferior quando as estirpes foram cultivadas para desrepressão da nitrogenase. Esses dados são próximos aos observados anteriormente por Vitorino e colaboradores (2001) em ensaio de atividade transferásica de GS com a estirpe HM053, e diferem das diferenças encontradas por Machado e colaboradores (1991) entre essas duas estirpes, já que as atividades transferásicas detectadas por esse último para o mutante HM053 foram numericamente inferiores em relação aos resultados do presente estudo, particularmente para GS não adenililada ( $+\text{Mg}^{2+}$ ) nas duas condições de cultivo. Apesar disso, é notório que as atividades de GST total ou não modificada da estirpe selvagem são expressivamente superiores em relação ao mutante HM053 (três a quinze vezes maior), e esse padrão foi reproduzível entre os estudos em questão.

Ainda em relação aos mutantes de *glnA*, é válido ressaltar que não foram observadas grandes diferenças para as atividades GST total ou de GS não adenililada entre as estirpes HM053, *glnAP347L* e *glnAP347L-M185P-NifA* cultivadas na ausência ou presença de nitrogênio, apesar de a enzima dessa última ter apresentado ser levemente menos ativa em todas as condições testadas em relação às das demais.

Em relação ao mutante  $\text{FP2}\Delta\text{Ngl}nE$ , a atividade transferásica de GS total foi similar à estirpe FP2 em condições de limitação de nitrogênio, entretanto, a atividade transferásica de GS fisiologicamente ativa mostrou ser apenas 20% menor em relação à da fração total para a estirpe  $\text{FP2}\Delta\text{Ngl}nE$ , e 27% menor para a estirpe selvagem na mesma condição. Esse resultado não era esperado, visto que a deleção do domínio N-terminal de GlnE a princípio promoveria a inativação da atividade removedora de grupos adenilil dos monômeros de GS (AR), a qual permaneceria majoritariamente adenililada e, por consequência, com baixa atividade. Por outro lado, a atividade de GS total foi reduzida em mais de 60% quando o mutante  $\text{FP2}\Delta\text{Ngl}nE$  foi cultivado em alto amônio em relação à condição de limitação de nitrogênio, enquanto para a estirpe selvagem essa diminuição foi de cerca de 50%, conforme mencionado anteriormente. Além disso, a atividade detectada para a fração de GS não modificada de  $\text{FP2}\Delta\text{Ngl}nE$  na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mostrou ser correspondente a mais de 70% da atividade da fração total, enquanto para a estirpe selvagem foi de aproximadamente 21%. Em conjunção, esses resultados sugerem que a enzima glutamina sintetase do mutante  $\text{FP2}\Delta\text{Ngl}nE$  não sofre

adenililação ou é somente parcialmente modificada, ou seja, é possível que a deleção do domínio N-terminal de GlnE tenha causado efeito deletério sobre o domínio ATase.

Em relação ao mutante FP2*glnD*\*, foi observada uma redução ligeiramente menor na atividade transferásica de GS total da condição de limitação de nitrogênio para a condição de alto amônio em comparação com a estirpe FP2. Porém, a atividade da fração fisiologicamente ativa de GS detectada para o mutante FP2*glnD*\* foi somente em torno de 38% e 19% em relação à da fração total quando analisada em condições de limitação e suficiência de nitrogênio, respectivamente. Esse resultado sugere que as mutações introduzidas em *glnD* promovem uma baixa concentração de GS ativa mesmo em condições de fixação de nitrogênio, o que é curioso, visto que uma abundância de PII-UMP deveria desencadear a remoção de grupos AMP dos monômeros de GS via GlnE. Por outro lado, é válido ressaltar que ainda não existe comprovação da interação direta entre PII ou PII-UMP e GlnE em *A. brasilense*. Interessantemente, esse fenótipo é comparável aos baixos níveis de atividade transferásica de GS fisiologicamente ativa para estirpe mutante em *glnA* (HM053), a qual mostrou apresentar transcrição acentuada do promotor de *glnB* em condições de alto amônio em estudo anterior (VITORINO *et al.*, 2001). Dessa forma, esses resultados sugerem um mecanismo contrário ao proposto em *E. coli*, com uma possível correlação entre altos níveis de PII uridililada e a manutenção de GS modificada e com baixa atividade.

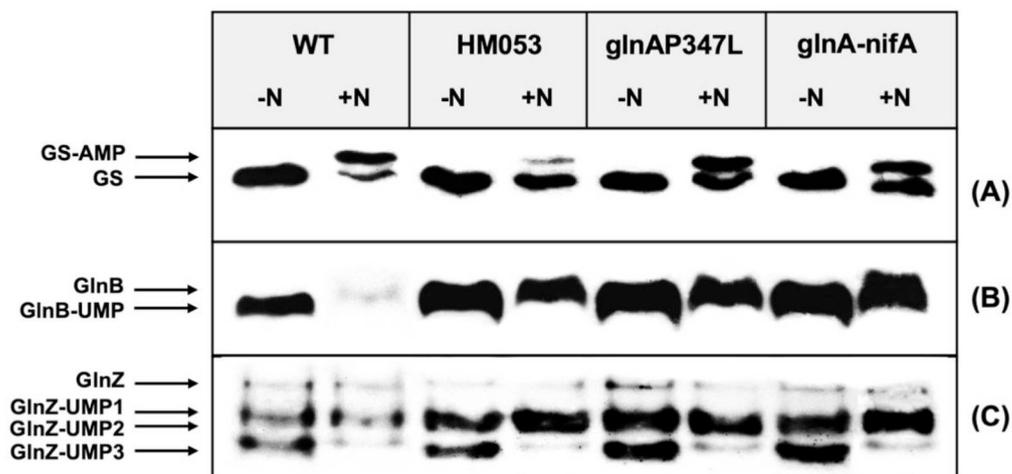
Além disso, é possível observar que os mutantes FP2Δ*NglnEglnD*\* e FP2Δ*NglnEglnD*\*-V177G-NifA apresentam atividade GST total consideravelmente mais baixa na ausência ou presença de nitrogênio quando comparados à estirpe FP2, aos mutantes individuais FP2Δ*NglnE* e FP2*glnD*\*, ou mesmo às estirpes excretoras de amônio com mutação em *glnA*. Esse resultado correlaciona com os fenótipos de fixação de nitrogênio constitutivo e excreção de amônio. Além disso, a baixa atividade de GS ativa na ausência de nitrogênio corrobora com o perfil observado nas curvas de crescimento dos mutantes FP2Δ*NglnEglnD*\* e FP2Δ*NglnEglnD*\*-V177G-NifA, que mostraram uma deficiência em relação à estirpe selvagem e serem beneficiados pela suplementação de glutamina externa. Por outro lado, a redução quase completa da atividade transferásica total nessas estirpes não era esperada e é de difícil explicação, dado os fenótipos dos mutantes individuais nos genes *glnE* ou *glnD*. Igualmente, a medição de atividades de GST maiores na presença de Mg<sup>2+</sup> implica em que, ao menos para estas estirpes, a atividade de GS esteja sendo influenciada por alguma outra modificação, que faz com que a conhecida correlação entre atividade de GS e estado de adenililação não seja mais válida. É possível que haja alteração de expressão de GS nessas estirpes, ou ainda a presença de algum repressor/inibidor de atividade (por exemplo, algum componente de regulação alostérica conhecido) em maiores quantidades em relação à estirpe selvagem.

Alternativamente, é possível que a deleção do domínio N-terminal de GlnE tenha causado um efeito deletério sobre o domínio ATase, o que impossibilitaria adenililação de GS e, conseqüentemente, levaria a síntese de glutamina. Uma vez que o mutante FP2ΔN*glnEglnD*\* também apresenta mutações pontuais inativadoras inseridas no domínio HD de GlnD, mesmo na presença de altos níveis de glutamina, que a princípio estimularia a atividade UR de GlnD, PII continuaria em seu estado uridililado (GlnB-UMP). Nesse caso, a falha na sinalização de excesso de glutamina intracelular permitiria sua síntese continuada. Essa hipótese contribuiria para a explicação do fenótipo de maior atividade transferásica de GS ativa pelos mutantes FP2ΔN*glnE*, FP2ΔN*glnEglnD*\* e FP2ΔN*glnEglnD*\*-V177G-NifA cultivados em condições de suficiência de nitrogênio, que acarretaria no aumento do fluxo de incorporação de amônio em glutamina.

### **5.9 Avaliação da expressão e estado de modificação pós-traducional de GS e PII nos mutantes construídos**

Os resultados aparentemente controversos obtidos a partir da medição de atividade GST levaram à realização de ensaios de *immunoblotting* para detecção e identificação de proteínas relacionadas à assimilação de amônio nos extratos celulares dos mutantes contendo alterações em *glnA*, *glnE*, e *glnD*, visando encontrar, nos padrões de expressão das proteínas GS, GlnB e GlnZ, alguma possível explicação para a atividade GST atípica. Para isto, foram obtidos extratos proteicos das estirpes crescidas em condições de fixação ou suficiência de nitrogênio, de forma análoga à descrita na seção 4.11.3.1. Na sequência, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (Native-PAGE) ou desnaturantes (SDS-PAGE) para a análise de PII e GS, respectivamente. Após transferência para membranas do tipo PVDF, os alvos de interesse foram detectados por meio da incubação com anticorpos anti-GS, anti-GlnB e anti-GlnZ, conforme descrito na seção 4.10.3. Os resultados dos filmes revelados são mostrados nas Figuras 56 e 57 adiante.

**Figura 56 - Expressão e perfil de modificação pós-traducional de GS, GlnB e GlnZ nas estirpes selvagem e mutantes de *glnA* de *A. brasilense***



A estirpe selvagem (FP2) e as estirpes excretoras de amônio (HM053, *glnAP347L* e *glnAP347L*-M185P-NifA) de *A. brasilense* foram inicialmente cultivadas em meio NFbHPN-lactato líquido. Células coletadas de cada estirpe foram desreprimidas para fixação de nitrogênio sob concentração de oxigênio da fase gasosa ajustada (6%) e privação de nitrogênio (-N), ou cultivadas na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (+N). Os extratos celulares foram preparados após período de incubação de quatro horas e submetidos a SDS-PAGE ou Native-PAGE, seguido de *western-blotting* usando anticorpos anti-GS (A) ou anti-PII (GlnB e GlnZ) (B e C), respectivamente.

A análise dos níveis de expressão de GS na estirpe selvagem revelou abundância de proteína em condições de fixação de nitrogênio, a qual é diminuída mediante altas concentrações de amônio e mantida predominantemente em sua forma adenililada, conforme esperado. Como mencionado anteriormente, em *A. brasilense* a expressão do gene *glnA* ocorre a partir três promotores diferentes, sendo dois localizados à montante de *glnB* (*glnBp1*- $\sigma^{70}$  e *glnBp2*- $\sigma^N$ ) e um terceiro promotor regulado por nitrogênio e pouco caracterizado localizado na região intergênica de *glnBA*, e mais ativo sob excesso de nitrogênio (*glnAp*) (DE ZAMAROCZY et al., 1993). Mediante privação de nitrogênio, *glnB* e *glnA* são co-transcritos em altos níveis a partir do promotor *glnBp2*- $\sigma^N$ , o qual é ativado por NtrC. Quando os níveis de nitrogênio se tornam elevados, esses genes são co-transcritos em um nível mais baixo a partir do promotor *glnBp1*- $\sigma^{70}$ , o qual sobrepõe um sítio de ligação a NtrC (HUERGO et al., 2003).

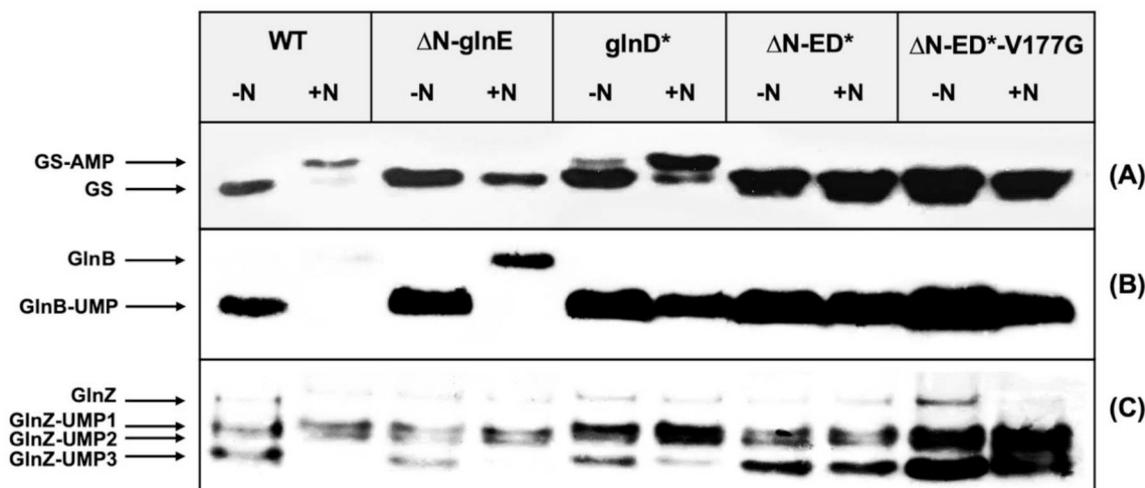
Em relação ao mutante HM053, foi observado um nível de expressão semelhante àquele visto para FP2 em ambas as condições, entretanto, na presença alto amônio, a GS de HM053 é fracamente modificada, indicando alteração do mecanismo de regulação pós-traducional da enzima e confirmando dados prévios publicados por Santos e colaboradores (2017) e Ghenov e colaboradores (2019). No que diz respeito aos mutantes pontuais de *glnA* construídos neste estudo, foi possível observar um nível de expressão similar de glutamina sintetase mediante crescimento em condições de fixação de nitrogênio em relação às estirpes FP2 e HM053.

Entretanto, níveis superiores de proteína foram detectados nos extratos provenientes de *glnAP347L* cultivado em altas concentrações de amônio, e, diferentemente do observado em HM053, *glnAP347L* apresentou alta taxa de adenililação de GS. Esse resultado aponta diferença nos níveis de transcrição de *glnA* a partir de *glnBp1- $\sigma^{70}$*  e/ou *glnAp* e nos mecanismos de controle pós-traducional de GS das estirpes *glnAP347L* e *glnAP347L-M185P-NifA* em comparação com o mutante HM053, sugerindo que, embora a mutação P347L de GlnA explique praticamente todo o fenótipo de HM053 quanto à atividade de nitrogenase, este mutante contém também outras mutações relevantes para o metabolismo de nitrogênio. Por outro lado, é válido ressaltar que o padrão de adenililação de GS observado tanto para HM053 quanto para *glnAP347L* é diferente do esperado de acordo com a proporção entre atividade GST na presença e ausência de  $Mg^{2+}$ , mostrada na Tabela 13. Isto indica que, para proteínas contendo esta mutação, não é válido associar diferenças de atividade nestes dois ensaios à diferenças de adenililação.

As análises de *western-blotting* também revelaram um alto nível de expressão de GlnB em todas as estirpes cultivadas em condições de baixo nitrogênio, a qual é mantida totalmente uridililada, presumivelmente pela atividade UTase de GlnD, como era esperado (Figura 56). Entretanto, baixos níveis de GlnB não modificada foram detectados para a estirpe selvagem em alto amônio, enquanto altos níveis da proteína em ambas as formas GlnB ou GlnB-UMP foram obtidos para as estirpes excretoras de amônio, especialmente para o mutante *glnAP347L-M185P-NifA* cultivado em 10 mM de  $NH_4Cl$ , o qual exibiu quantidade superior de GlnB uridililada em relação aos demais. Esses resultados são compatíveis com os dados de fixação de nitrogênio constitutiva e excreção de amônio para essas estirpes discutidos anteriormente. Além disso, esses resultados reforçam dados de ativação de fusão *glnB::lacZ* em ensaios de  $\beta$ -galactosidase com a estirpe HM053, os quais revelaram que a expressão do promotor de *glnB* é desregulada e ocorre de forma irresponsiva aos níveis de amônio intracelulares (VITORINO *et al.*, 2001).

Semelhantemente ao padrão observado para GlnB, a expressão de GlnZ na estirpe selvagem parece ser parcialmente reprimida pelos níveis de amônio. Já para mutantes pontuais de *glnA* foi possível detectar níveis superiores de GlnZ totalmente uridililada (GlnZ-UMP<sub>3</sub>) e parcialmente uridililada (GlnZ-UMP<sub>1</sub> e GlnZ-UMP<sub>2</sub>), especialmente nos extratos proteicos provenientes de células cultivadas em meio contendo 10 mM de  $NH_4Cl$ . Esses resultados apontam para desregulação mais acentuada do promotor de *glnZ* nas estirpes excretoras de amônio e, juntamente com os dados anteriores, confirmam uma alteração no sensoriamento de nitrogênio nesses mutantes.

**Figura 57 - Expressão e perfil de modificação pós-traducional de GS, GlnB e GlnZ nas estirpes selvagem e mutantes de *glnE* e *glnD* de *A. brasilense***



A estirpe selvagem (FP2), os mutantes individuais nos genes *glnE* e *glnD* ( $\Delta N$ -*glnE* e *glnD*\*) e as estirpes excretoras de amônio ( $\Delta N$ -*glnE* e  $\Delta N$ -ED -V177G) de *A. brasilense* foram inicialmente cultivadas em meio NFbHPN-lactato líquido. Células coletadas de cada estirpe foram desreprimidas para fixação de nitrogênio sob concentração de oxigênio da fase gasosa ajustada (6%) e privação de nitrogênio (-N), ou cultivadas na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (+N). Os extratos celulares foram preparados após período de incubação de quatro horas e 10  $\mu\text{g}$  de cada amostra (exceto para detecção de GlnB nas amostras FP2/+N e  $\Delta N$ -*glnE*/+N, cuja quantidade foi de 25  $\mu\text{g}$ ) foram submetidas à SDS-PAGE ou Native-PAGE, seguido de *western-blotting* usando anticorpos anti-GS (A) ou anti-PII (GlnB e GlnZ) (B e C), respectivamente.

A Figura 57 mostra os níveis de proteicos de GS, GlnB e GlnZ nas estirpes mutantes nos genes *glnE* e *glnD* de *A. brasilense*. Assim como observado na Figura 56, na estirpe FP2 a expressão de GS é parcialmente reprimida pelo *status* de nitrogênio intracelular, e uma vez expressa, a enzima é modificada em seus monômeros pela adição de grupos AMP na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Interessantemente, apesar de também ter sua expressão parcialmente reduzida pela disponibilidade de nitrogênio, a glutamina sintetase do mutante FP2 $\Delta N$ *glnE* não sofre modificação pós-traducional. Esse resultado não era esperado, visto que a deleção do domínio N-terminal de GlnE deveria inativar sua atividade AR, o que manteria GS sempre adenililada. Esse resultado confirma a hipótese de que a truncagem introduzida tenha tido um efeito deletério sobre o domínio ATase de GlnE, resultando em uma enzima de baixa atividade, instável ou mesmo fracamente expressa. Por outro lado, a incapacidade de modificação de GS por esse mutante explica a maior parte do perfil visto nos ensaios de atividade transferásica (Tabela 13), com uma alta porcentagem de GS não adenililada ativa em relação à atividade transferásica total em ambas as condições de cultivo avaliadas. A constatação de que este mutante é incapaz de adenililar GS conduz também a outra observação: a correspondência entre atividade GST na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$  e GST na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  não é 1:1 caso todo o estoque de GS esteja totalmente desadenililado, mas sim 1:0,8 nas condições deste ensaio.

Além disso, a Figura 57 mostra níveis semelhantes de expressão de GS no mutante FP2*glnD*\* cultivado tanto em baixo quanto em alto amônio, e superiores em relação à estirpe selvagem em ambas as condições. Esse padrão indica uma provável desregulação de *glnBp* ou *glnAp*, o que era esperado, uma vez que, GlnB permanentemente mantida em sua forma uridililada torna-se incapaz de interagir com NtrB, que fosforila NtrC. NtrC-P, por sua vez, ativa a transcrição de vários operons regulados por nitrogênio por meio da interação com o fator  $\sigma^N$  da RNA polimerase, dentre eles, aquele envolvendo o promotor *glnBp2*- $\sigma^N$ . Como resultado, maiores níveis de transcrição de *glnA* ocorrem, além de *glnB*. É possível ainda observar uma pequena fração de GS-AMP presente nos extratos da condição de baixo amônio, o que é curioso, visto que as mutações inseridas em *glnD* deveriam potencializar a sinalização de escassez de nitrogênio intracelular via PII-UMP, que por sua vez resultaria em GS totalmente não modificada. Por outro lado, esse resultado auxilia na interpretação da baixa porcentagem de GST da fração fisiologicamente ativa de GS obtida para o mutante FP2*glnD*\* em condições de limitação de nitrogênio, a qual foi de aproximadamente 38% contra 73% para a estirpe FP2.

Em relação aos mutantes FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\* e FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\*-V177G-NifA, foi detectada uma quantidade expressivamente maior de GS em relação à estirpe selvagem tanto em condições de limitação quanto suficiência de nitrogênio, a qual encontra-se totalmente não adenililada. A grande quantidade de GS observada no *immunoblot* é completamente contrária ao esperado pela baixa atividade GST detectada nesses mutantes, e é um claro sinal da ocorrência de alguma outra forma de regulação da atividade de GS que está particularmente ativa quando a mutação as mutações em *glnE* e *glnD* são combinadas. Assim como discutido para o mutante FP2*glnD*\*, é provável que esses mutantes apresentem desregulação dos promotores de *glnB* e/ou *glnA*, o que promove altos níveis totais de GS de forma não responsiva ao *status* de nitrogênio intracelular. Entretanto, uma vez que esses mutantes também possuem truncagem do domínio AR de GlnE que, como discutido anteriormente, resulta em falha de ambas as atividades (AR e ATase), não há adenilação de GS, o que não é observado no mutante FP2*glnD*\*. Por outro lado, é válido ressaltar a presença de uma segunda banda localizada logo abaixo da forma não modificada de GS. Essa informação será explorada em detalhes na seção 5.10.

No que se refere à GlnB, é possível observar um perfil semelhante de modificação pós-traducional e de repressão parcial da expressão proteica em resposta a altas concentrações de amônio nas estirpes FP2 e FP2 $\Delta$ *NglnE*, com a diferença de que maiores quantidades de proteína foram detectadas para essa última nas duas condições testadas. A maior produção de GlnB na presença de amônio no mutante FP2 $\Delta$ *NglnE* – cuja atividade de GS é mais elevada que a da estirpe selvagem levando, em teoria, a uma maior disponibilidade de glutamina e consequente

desuridililação de GlnB e repressão de sua transcrição – é bastante intrigante, especialmente levando em consideração que toda a GlnB produzida está desuridililada; um sinal de que o mutante está em suficiência de nitrogênio e deveria estar reprimindo a transcrição de *glnBA*. Já para o mutante FP2*glnD*\*, foram detectados níveis consideravelmente superiores de GlnB em relação a sua estirpe parental. Além disso, não foram encontradas grandes diferenças na quantidade de proteína detectada ou no estado de modificação pós-traducional entre as condições de alto e baixo nitrogênio, sendo GlnB mantida totalmente uridililada no mutante FP2*glnD*\*. A partir desse resultado, é possível concluir que somente as mutações pontuais inseridas nas posições H552 e D553 são suficientes para eliminar a atividade UR de GlnD, sem comprometer a atividade dos demais domínios. Além disso, esse resultado sugere corrobora com a hipótese de que o mutante FP2*glnD*\* provavelmente apresente perturbação do sistema NtrBC e desregulação de *glnBp*, que resulta em maiores níveis de transcritos de *glnA* e *glnB*. Em relação aos mutantes excretadores de amônio, FP2Δ*NglnEglnD*\* e FP2Δ*NglnEglnD*\*-V177G-NifA, foi observado um padrão similar ao mutante FP2*glnD*\*, porém com níveis ainda maiores de GlnB-UMP detectados.

Assim como observado para GlnB, foi possível observar um padrão análogo de repressão parcial da expressão de GlnZ em resposta a altos níveis de nitrogênio nas estirpes FP2 e FP2Δ*NglnE*, porém, é válido destacar duas diferenças importantes: ao contrário de GlnB, GlnZ parece ser mantida majoritariamente em suas formas GlnZ-UMP<sub>1</sub> e GlnZ-UMP<sub>2</sub> na presença de alto amônio; e não foi notada diferença clara na quantidade de proteína detectada entre as estirpes FP2 e FP2Δ*NglnE* nas duas condições de cultivo avaliadas. No que se refere ao mutante FP2*glnD*\*, assim como observado para GlnB, GlnZ uridililada mostrou ser mais abundante tanto em alto quanto em baixo amônio em relação à estirpe parental, sendo possível detectar a forma GlnZ-UMP<sub>3</sub> mesmo nos extratos provenientes de células cultivadas na presença de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl.

As análises de *western-blotting* também revelaram um alto nível de expressão de GlnZ no mutante FP2Δ*NglnEglnD*\*, com significativo aumento da fração de GlnZ-UMP<sub>3</sub> em relação ao mutante FP2*glnD*\*. Essa diferença foi ainda maior no mutante FP2Δ*NglnEglnD*\*-V177G-NifA, que mostrou apresentar grande abundância de GlnZ-UMP<sub>1</sub>, GlnZ-UMP<sub>2</sub> e GlnZ-UMP<sub>3</sub> em condições de fixação ou suficiência de nitrogênio, sugerindo desregulação também do promotor de *glnZ*.

Em conjunção, esses dados revelam que a perda da capacidade de sensoriamento do *status* de nitrogênio intracelular por estirpes com fenótipos de fixação de nitrogênio constitutiva e excreção de amônio requer uma perda da sinalização de glutamina intracelular devido à modificação pós-tradicional de GS ou pela baixa atividade intrínseca dessa enzima ocasionada

por outro fator que não a modificação de seus monômeros. Além disso, torna-se necessária uma abundância das proteínas transdutoras de sinal GlnB e GlnZ em suas formas uridililadas, que por sua vez resulta em uma perturbação do sistema *ntrBC*, com a concomitante ativação constitutiva da transcrição de diversos operons regulados por nitrogênio. Como resultado, há uma desregulação de promotores como *glnBp2- $\sigma^N$* , que gera ainda mais GlnB-UMP. Dessa forma, a ativação constitutiva da transcrição dos genes *nif* devido perda do sensoriamento dos níveis de nitrogênio, juntamente com baixas taxas de incorporação de amônio em glutamina por GS, permitem a excreção de amônio.

## 5.10 Estudo da glutamina sintetase do mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\*

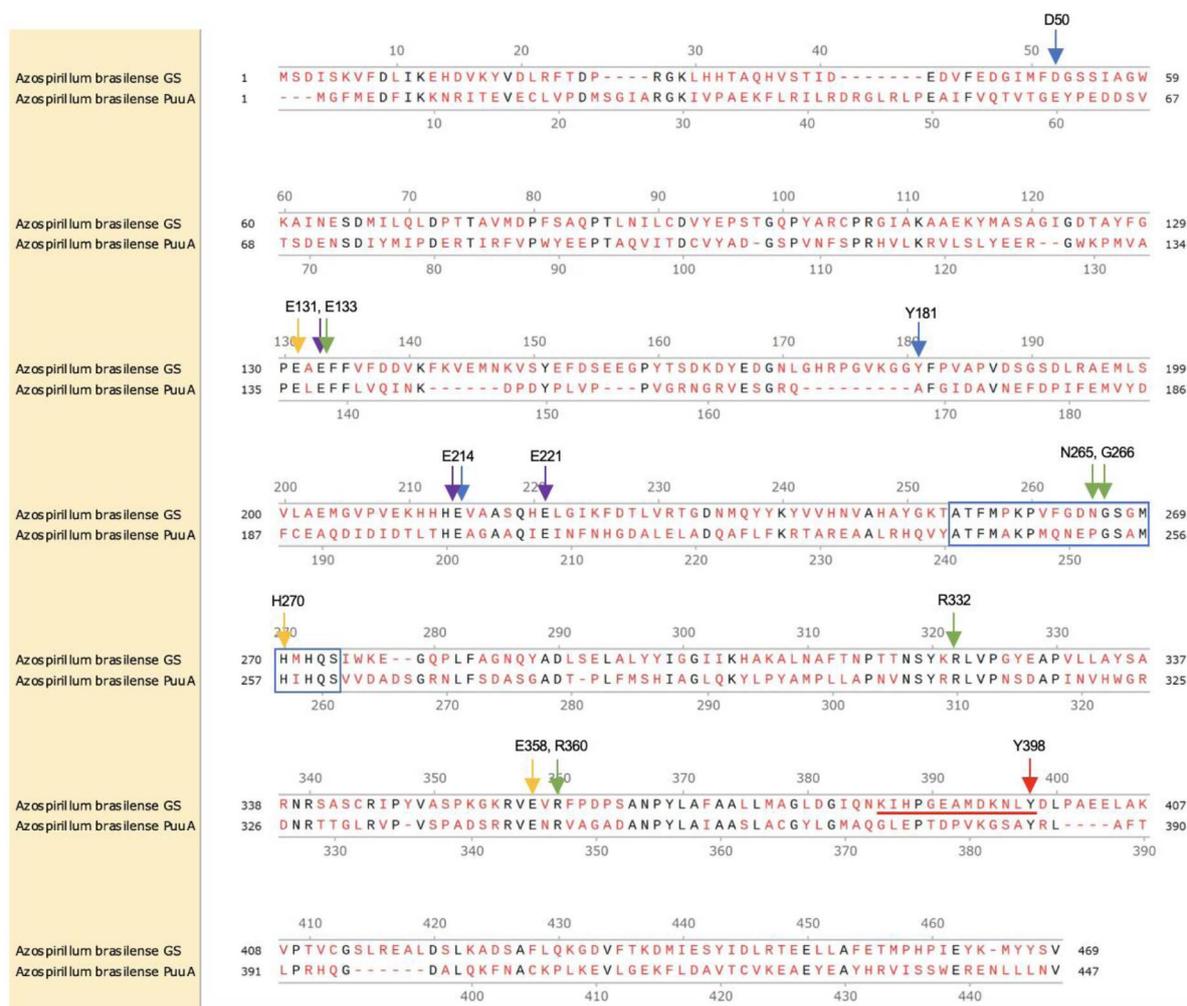
### 5.10.1 Busca de proteínas homólogas de GS no genoma de *A. brasilense*

Conforme discutido na seção 5.9, durante a análise dos níveis de expressão de GS no mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\* por *western-blotting*, foi identificado o aparecimento de uma segunda banda abaixo da linha de base correspondente à fração não adenililada da enzima. Curiosamente, essa banda proteica não foi identificada nos extratos da estirpe selvagem ou dos mutantes individuais nos genes *glnE* ou *glnD*. Uma hipótese para explicar o surgimento desta banda seria a presença de alguma proteína com alta homologia com GS, cujo nível de expressão aumentasse fortemente no mutante FP2 $\Delta$ *NglnEglnD*\*. Com o intuito de elucidar a identidade desta proteína detectada, inicialmente foi feita uma busca por sequências com similaridade à sequência de *AbGS* contra o genoma de *A. brasilense* FP2, utilizando o algoritmo *blastp*. O resultado da análise de sequências com alinhamento significativo revelou uma proteína da super família das glutaminas sintetases (código de referência do NCBI, WP\_094302065.1) com identidade igual a 32% a *AbGS* (Figura 58).

Em *E. coli*, organismo no qual essa proteína foi mais bem caracterizada, foi demonstrado se tratar de uma  $\gamma$ -glutamil-putrescina sintetase, que catalisa a glutamilação de putrescina, primeira etapa de uma via de utilização de putrescina (G8ALX8, anotação UniProt). Essa via é de extrema importância, dado que o acúmulo de poliaminas pode levar à inibição do crescimento bacteriano (KURIHARA *et al.*, 2008). Apesar de *PuuA* não ser capaz de formar glutamina a partir de amônia e glutamato neste organismo, as reações catalisadas por GS e *PuuA* são similares no que diz respeito à formação de uma ligação amida entre o grupo carboxila na posição  $\gamma$  do glutamato e amônia ou entre o grupo carboxila na posição  $\gamma$  do glutamato e o grupo amino da putrescina por GS e *PuuA*, respectivamente. Além disso, análises de gel filtração revelaram que, assim como GS, *PuuA* existe como um dodecâmero em seu

estado nativo, e sua atividade requer  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (KURIHARA *et al.*, 2008; EISENBERG *et al.*, 2000).

**Figura 58 - Alinhamento total das proteínas GS e PuuA de *A. brasilense***



A sequência de aminoácidos das proteínas GS e PuuA de *A. brasilense* foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW no programa MEGAX, que mostrou uma identidade de 32%. Os parâmetros padrão foram mantidos para o alinhamento múltiplo de sequências (Gonnet matrix, residue-specific penalties ON, hydrophilic penalties ON, gap separation matrix 4). Os aminoácidos conservados são mostrados em preto, e os resíduos não conservados em vermelho. No alinhamento são destacados os resíduos envolvidos na ligação de glutamato e amônio pelas setas azul e verde, respectivamente. Os resíduos envolvidos no sítio de ligação n1 e n2 de cátions bivalentes são mostrados através das setas roxa e amarela, respectivamente. A região do sítio de adenililação é sublinhada em vermelho, com o resíduo de tirosina (Y) adenililado destacado com uma seta em vermelho. A região de ligação a ATP é destacada na caixa em azul.

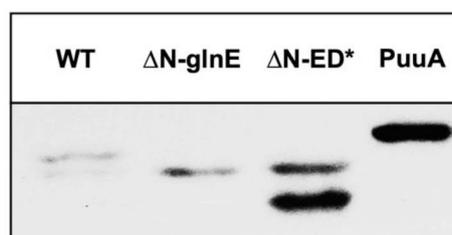
O alinhamento das sequências de *AbGS* e *AbPuuA* revelou conservação de aminoácidos catalíticos importantes entre as duas proteínas. Como discutido anteriormente, a enzima glutamina sintetase possui dois sítios de ligação a íon metal bivalente, comumente referidos como n1 e n2. Os resíduos de glutamato E133, E214 e E221, participantes do sítio n1 (correspondentes a E131, E212 e E220 em *EcGS*) e descritos como importantes para a mudança conformacional responsável pela atividade da enzima, são conservados nas sequências de *AbGS*

e *AbPuuA* (Figura 58). De forma análoga, os resíduos E131, H270 e E358, participantes do sítio n2 (E129, H269 e E357 em *EcGS*), também são conservados entre ambas as sequências. Diferentemente do observado para a sequência de *EcPuuA*, um dos três resíduos relatados como importantes para a ligação de amônio por GS, E214, é compartilhado por *AbPuuA* e em um outro, D50, é substituído por um resíduo similar na posição (E50).

Estudos recentes de caracterização de *PuuA* de *A. brasilense* utilizando o ensaio enzimático acoplado proposto por Kurihara e colaboradores (2008) não foram promissores, o que indica que possivelmente uma outra molécula desconhecida seja requerida para a atividade da enzima (Edileusa Cristina Marques Gerhardt, dados não mostrados). Por outro lado, dadas as diferenças entre as *EcPuuA* e *AbPuuA*, principalmente no que diz respeito aos sítios de ligação a amônio, é possível que as enzimas catalisem reações distintas ou mesmo que *PuuA* apresente atividade de glutamina sintetase em *A. brasilense*, o que ainda não foi testado.

Após o estudo de similaridade entre essas proteínas, foi especulado se a segunda banda abundantemente expressa no mutante *FP2ΔNglN EglND\** tanto em condições de limitação quanto suficiência de nitrogênio poderia ser *PuuA* detectada paralelamente com GS. Para responder a essa pergunta, foi utilizada a técnica de *western-blotting* para verificar a capacidade do anticorpo anti-GS de se ligar à *AbPuuA*. Convenientemente, uma fração semi-purificada dessa proteína foi concedida pela doutoranda Franciéle de Lima do NFN da UFPR. Amostras dos extratos proteicos obtidos para as estirpes *FP2*, *FP2ΔNglNE* e *FP2ΔNglNEglND\** e da proteína *PuuA* nativa semi-purificada foram analisadas por SDS-PAGE, seguido de *western-blotting* (ver seção 4.10.3). O resultado é mostrado na Figura 59.

**Figura 59 - Análise da especificidade do anticorpo anti-GS de *A. brasilense***



A estirpe selvagem e os mutantes *FP2ΔNglNE* e *FP2ΔNglNEglND\** de *A. brasilense* foram inicialmente cultivados em meio NFbHPN-lactato. Células coletadas de cada estirpe foram cultivadas na presença de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sob concentração de oxigênio da fase gasosa ajustada (6%) por um período de 4 horas a 120 rpm, 30°C. Os extratos celulares foram preparados após período de incubação e 10  $\mu\text{g}$  de cada amostra (exceto para *PuuA* nativa, cuja quantidade foi em torno de 2  $\mu\text{g}$ ) foram submetidas à SDS-PAGE 7,5%, seguido de *western-blotting* usando anticorpos anti-GS.

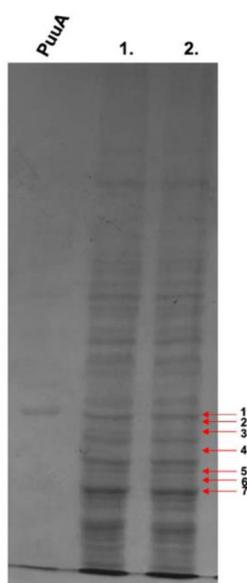
O resultado da análise de *western-blotting* revelou um padrão similar ao observado anteriormente (Figura 57), com a GS da estirpe *FP2* presente em suas formas adenililada e não adenililada, e a GS do mutante *FP2ΔNglNE* não modificada em alto amônio. Além disso, foi

detectada uma maior quantidade de proteína para o mutante *FP2ΔNglEglnD\** em relação às demais estirpes, com o aparecimento de uma banda adicional, a qual mostrou ser mais intensa do que a banda referente à forma não adenililada de GS. No que diz respeito à especificidade do anticorpo anti-GS, o resultado revelou que *AbPuuA* também pode ser detectada; entretanto, a migração mais lenta dessa proteína mostrou que a banda adicional detectada no mutante *FP2ΔNglEglnD\** não se trata de *PuuA*, e sim alguma forma de GS modificada ou ainda outra proteína de função desconhecida

### 5.10.2 Identificação de GS por MALDI-TOF/MS

Diante da comprovação experimental de que a banda adicional detectada com anticorpo anti-GS durante as análises de expressão de GS no mutante *FP2ΔNglEglnD\** não se tratava de *PuuA*, numa próxima etapa foi feita a investigação da identidade dessa proteína por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/MS. Para isso, amostras do extrato proteico das estirpes FP2 e do mutante *FP2ΔNglEglnD\** cultivados em alto nitrogênio foram analisadas em gel SDS-PAGE 7,5%, conforme descrito na seção 4.10.2.1. A condição de alto amônio foi escolhida por permitir a visualização das formas adenililada e não adenililada de GS, e também por não interferir no nível de expressão de GS no mutante (ver Figura 57). Depois de concluída a eletroforese e corado o gel, diversas secções da região que compreende a posição de GS no gel foram recortadas em paralelo das linhas das estirpes FP2 e *FP2ΔNglEglnD\** (Figura 60).

**Figura 60 – Perfil de proteínas do extrato das estirpes FP2 e *FP2ΔNglEglnD\** cultivadas em alto nitrogênio**



Amostras de extratos proteicos das estirpes FP2 e *FP2ΔNglEglnD\** foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, e a corrida foi acompanhada com um marcador pré-corado de proteínas. Os números 1 e 2 na região superior da figura representam as amostras oriundas das estirpes FP2 e

**FP2ΔN*glnE*glnD\***, respectivamente. Os números indicados na lateral representam as regiões recortadas do gel previamente corado com azul de coomassie para as análises de identificação de proteína por MALDI-TOF.

Uma vez recortadas do gel, as bandas foram descoradas e tratadas com tripsina, sendo posteriormente submetidas à análise de MALDI-TOF (4.10.4.2). A lista de picos obtida do experimento de espectrometria de massas foi então comparada com um banco de dados de sequências proteicas traduzido do genoma de *A. brasilense* Sp245 e digeridas *in silico* com tripsina, utilizando a ferramenta MASCOT (4.10.4.2), buscando encontrar entre as sequências de proteínas, uma ou mais que contivessem fragmentos com massa predita compatíveis com as massas obtidas no experimento. O algoritmo identificou a presença de GS com alto grau de confiança estatística na identificação (*score* 32), conseguindo atribuir até 11 fragmentos a GS, cobrindo 29% da sequência da proteína (dado não mostrado). Infelizmente, nenhum fragmento contendo o resíduo adenililável Y398 pôde ser identificado nas amostras.

A exploração individual das amostras com o programa MASCOT também permitiu identificar que dois fragmentos de massa compatível com GS, com massa monoisotópica teórica calculada em 1718,9475 e 3390,5032, estavam particularmente associados à presença de GS nas amostras. A fim de poder melhor comparar as amostras quanto à presença de GS, optou-se por utilizar uma planilha customizada construída no software Microsoft Excel para correlacionar a lista de fragmentos possíveis de GS ( $m/z = 1$ ) gerados por digestão triptica com a lista de picos de cada amostra. O resultado é mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação entre as massas preditas e encontradas de fragmentos de GS obtidos por análise de MALDI-TOF

Massa predita	Localização em GlnA	Fragmento	Seções do gel													
			FP2							FP2Δ <i>NghEglnD</i> *						
			1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
658.3995	356-360	RVEVR														
666.3457	432-437	GDVFTK														
815.4556	105-111	CPRGIAK	815.5496	815.5640	815.5405	815.5820	815.5331	815.5300	815.5410	815.5640	815.5223	815.5425	815.5221	815.5636	815.5483	815.5391
1254.6034	438-447	DMIESYIDLR	1254.6499	1254.6713	1254.6546					1254.6713		1254.6314				
1357.7011	241-252	YVVHNVAHAYGK	1357.7317	1357.7749			1357.6888			1357.7749			1357.6629	1357.7416		
1375.7103	396-407	NLYDLPAEELAK					1375.6741							1375.6927		
1556.7451	165-178	DYEDGNLGHPRGVK	1556.7991													
1636.7965	179-194	GGYFPVAPVDSGSDLR														
1692.8564	211-225	HHHEVAASQHELGIK										1692.8917				
1718.9475	323-338	LVPGYEAPVLLAYSAR		1718.9989	1718.9931	1718.9450	1718.9457	1718.9270		1718.9989	1718.9337	1718.9782	1718.9121	1718.9870	1718.9599	
1852.7759	149-164	VSYEFDSEEGPYTSDK		1852.9759						1852.9759						
1901.9313	432-447	GDVFTKDMIESYIDLR	1902.0153													
2048.0045	448-464	TEELLAFETMPHPYK	2048.0544									2048.0472				
2470.0602	144-164	VEMNKVSYEFDSEEGPYTSD K														2470.3149
2691.2720	448-469	TEELLAFETMPHPYKMY SV		2691.3049	2691.2740	2691.2803					2691.2897	2691.3446				
2847.2857	116-141	YMASAGIGDTAYFGPEAEFF VFDDVK					2847.2726									
3320.6540	179-210	GGYFPVAPVDSGSDLRAEML SVLAEMGVPVEK														
3390.5032	149-178	VSYEFDSEEGPYTSDKDYED GNLGHPRGVK			3390.5962	3390.5510	3390.5569	3390.512.000 0	3390.7050			3390.6215	3390.5059	3390.6786		
Total de picos compatíveis com GlnA			6	5	5	4	8	3	2	5	3	7	4	6	2	2
Total de picos anotados			97	91	53	49	77	45	45	91	42	67	62	100	41	55
% atribuído a GlnA			0.0618556 7	0.05494505 5	0.09433962 3	0.08163265 3	0.10389610 4	0.066666667	0.04444444 4	0.05494505 5	0.07142857 1	0.10447761 2	0.06451612 9	0.06	0.04878048 8	0.036363636

Após a extração do gel de poliácridamida, sete bandas proteicas proveniente dos extratos das estirpes FP2 (1.1-1.7) e FP2Δ*NghEglnD*\* (2.1-2.7) foram descoradas e tratadas com tripsina antes de serem submetidas à análise de MALDI-TOF, conforme descrito na seção 4.10.4.1. A lista de picos obtida foi comparada com um banco de dados de sequência proteicas traduzidas do genoma de *A. brasilense* Sp245 e digeridas *in silico* com tripsina, utilizando a ferramenta MASCOT (seção 4.10.4.2). A análise identificou a presença de GS (score 32), com um total de 11 fragmentos atribuídos. Na tabela são indicados os possíveis fragmentos teóricos da digestão com tripsina e a lista de picos obtidos para cada amostra analisada. Em vermelho são indicados os dois picos-referência, 1718,9475 e 3390,5032, particularmente associados à presença de GS. As colunas sombreadas representam identificação positiva de GS após fragmentação desses picos (MS/MS).

A análise mostrou a presença de possíveis fragmentos compatíveis com a digestão de GS em todas as amostras, mas em maior número (5–8) e maior representação (6–10% dos fragmentos totais) nas bandas 3 e 5 de cada *lane*, onde também foram confirmados por MS/MS. A banda 5 corresponde mais apropriadamente ao tamanho esperado para GS; sua presença banda 3 indica a possibilidade de produtos de degradação de GS estarem presentes tanto na estirpe selvagem quanto no duplo mutante. Alternativamente, é possível que a identificação positiva na banda 3 da *lane* 1 seja referente à proteína em sua forma adenilada, uma vez que foi utilizado extrato proteico da estirpe FP2 cultivada em alto amônio, condição que gera modificação de GS. Já para a *lane* 2, é possível que a detecção positiva de GS na banda 3 corresponda à proteína não modificada e extraída parcialmente da banda 5. Essa possibilidade não pode ser excluída, já que há uma expressão muito mais acentuada de GS no mutante FP2ΔNglNeglD\* em relação à FP2 (Figura 57). Além das bandas 3 e 5, também foi possível identificar um fragmento compatível com GS na banda 6 da *lane* 2, o qual foi confirmado por fragmentação de MS/MS; no entanto, este não foi confirmado na mesma banda da *lane* 1 (Tabela 14).

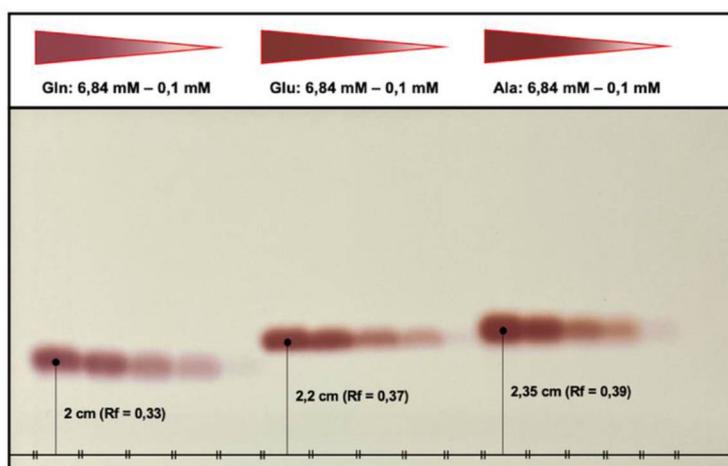
A fim de testar a possibilidade da presença de PuaA nas amostras, a mesma comparação foi realizada entre as listas de picos experimentalmente obtidas e a lista de fragmentos possíveis gerados da digestão triptica *in silico* de PuaA (dado não mostrado). O resultado da análise mostrou a presença de fragmentos compatíveis com PuaA nas amostras, com uma mesma distribuição que os fragmentos de GS, no entanto, não é possível confundir as duas. Dentre os 124 fragmentos com  $m/z=1$  previstos para GS e os 112 preditos para PuaA, há apenas 3 que possuem massas monoisotópicas com menos de 0,5 Da de proximidade entre si, e nenhum deles ocorre nas amostras analisadas.

A combinação dos resultados dos ensaios de *western-blotting* (Figura 59) e espectrometria de massas (Tabela 14) permite concluir que a banda adicional de proteína detectada durante a investigação dos níveis de expressão de GS no mutante FP2ΔNglNeglD\* não corresponde a PuaA. Além disso, é provável que esta proteína de identidade desconhecida seja mesmo GS com alguma modificação ainda não descrita, ou mesmo parcialmente degradada, já que foi possível identificar um fragmento de massa compatível com GS (1718,9475) na banda de número 6 da *lane* 2 (FP2ΔNglNeglD\*), porém não paralelamente na *lane* 1 (FP2).

### 5.11 Avaliação da capacidade dos mutantes de excretar outros compostos aminados

Após a discussão dos experimentos explorados nas seções 5.9 e 5.10, foi especulada a possibilidade de os mutantes construídos neste estudo secretarem algum outro composto aminado que não fosse  $\text{NH}_4^+$ . Como visto na Figura 57, os mutantes duplo e triplo nos genes *glnE*, *glnD*, e *nifA* mostraram apresentar altos níveis de expressão de GS, que por sua vez poderia gerar acúmulo de glutamina, por exemplo. Com o intuito de verificar essa ocorrência, foi empregada a técnica de cromatografia em camada delgada, com a revelação do produto com o reagente ninidrina (ver seção 4.13). A reação de ninidrina detecta a presença do grupo  $\alpha$ -amino livre dos aminoácidos e do grupo amino terminal de peptídeos e proteínas, gerando um composto conhecido como púrpura de Ruhemann, cuja concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 570 nm. A reação com o carbono  $\alpha$  de aminoácidos secundários como a prolina resultam em um produto diferente de coloração amarela, que pode ser quantificado no comprimento de onda de 440 nm. Inicialmente, visando examinar a sensibilidade de detecção da técnica, foram utilizadas diferentes concentrações de padrões dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina, variando de 0,1 mM até 6,84 mM. O resultado dessa análise preliminar é mostrado na Figura 61 abaixo.

**Figura 61 - Cromatografia em camada delgada com padrões de glutamina, glutamato e alanina**

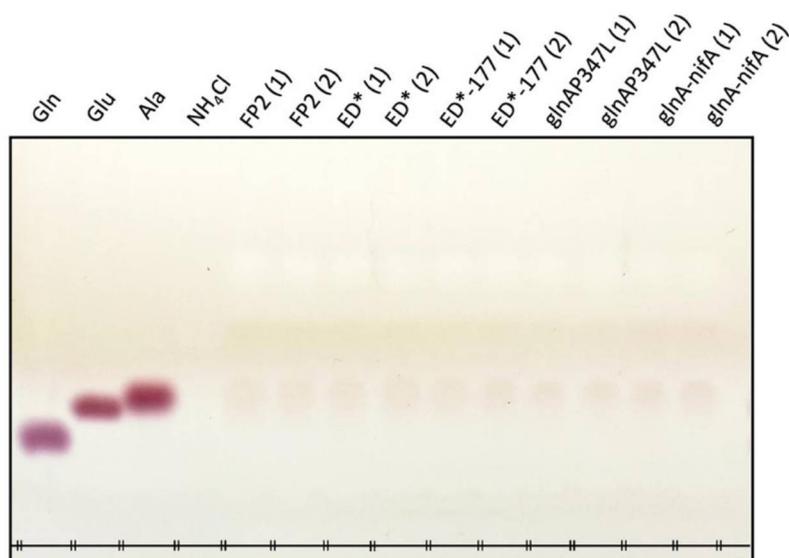


Padrões dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina nas concentrações de 6,84 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM e 0,1 mM foram aplicados na base de sílica de TLC, a qual foi depositada em câmara saturada com fase móvel composta por butanol, ácido acético e água na proporção de 3:1:1, conforme descrito na seção de materiais e métodos. Os valores de Rf (razão de fluxo) foram dados pela razão entre a distância percorrida pelas amostras (cm) e a distância percorrida pela fase móvel (cm).

A Figura 61 mostra que os aminoácidos glutamina, glutamato e alanina podem ser detectados mesmo nas menores concentrações testadas (0,1 mM). Além disso, as migrações mostraram ser bem resolvidas, isto é, foi possível obter uma separação relativamente clara entre as bandas dos diferentes padrões, dados os valores de Rf. Uma vez confirmado que o limite de

detecção da técnica era compatível com as concentrações determinadas para produto excretado pelos mutantes pelo método do indofenol (0,5-3,5 mM), as estirpes de interesse foram cultivadas em meio NFbHP-lactato semi-sólido (livre de nitrogênio) e incubadas em estufa a 30°C por até 72 horas, conforme descrito na seção 4.13.1. As amostras coletadas do sobrenadante foram depositadas em folhas de sílica para as análises de TLC, com a subsequente revelação com o reagente ninidrina (seção 4.13.2). O resultado da análise é mostrado na Figura 62 abaixo.

**Figura 62 - Cromatografia em camada delgada com o sobrenadante de culturas de estirpes excretoras de amônio**



As estirpes foram cultivadas em meio NFbHP-lactato semi-sólido (livre de nitrogênio) a 30°C. Aliquotas do sobrenadante das culturas foram coletadas após 48 horas e centrifugadas para remover o excesso de ágar. As amostras foram aplicadas na base de sílica de TLC, a qual foi depositada em câmara saturada com fase móvel composta por butanol, ácido acético e água na proporção de 3:1:1 (v:v:v), conforme descrito na seção de materiais e métodos. Padrões dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina na concentração de 5 mM foram adicionados como controles experimentais, assim como NH<sub>4</sub>Cl (100 mM). Os números entre parênteses representam duplicatas biológicas dentro da mesma linhagem. A análise das amostras coletadas nos tempos 24 e 72 horas foi feita de forma semelhante.

A Figura 62 mostra a identificação e separação dos padrões dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina, conforme visto anteriormente (Figura 61), e ausência de detecção de amônia mesmo em alta concentração; esta última parece não ser arrastada pela sílica pela fase móvel (dado não mostrado). Além disso, o experimento relevou ausência de detecção de quaisquer moléculas aminadas diferencialmente secretadas no sobrenadante das estirpes selvagem (FP2) ou excretoras de amônio (FP2Δ*NglnEglnD*\*, FP2Δ*NglnEglnD*\*-V177G-NifA, *glnAP347L* e *glnAP347L*-M185P-NifA). Essa análise reitera os resultados das dosagens feitas pelo método do indofenol, e o fenótipo de excreção de amônio, e não outros compostos, por esses mutantes.

## 6 CONCLUSÕES

- a) A expressão plasmidial das variantes de *AbNifA* QL2,  $\Delta$ GAF, M162V, V177G, M185P e M191P foi capaz de recuperar o fenótipo de FBN pelos mutantes nos genes *nifA*, *glnB* e *glnBglnZ* mesmo na presença de altos níveis de amônio, indicando que essas proteínas são ao menos parcialmente irresponsivas à disponibilidade de nitrogênio e à presença das proteínas PII;
- b) A transferência das variantes descritas no item “a” para o genoma de *A. brasilense* resultou em baixos níveis de fixação de nitrogênio em condições de alto amônio, e a deleção adicional do gene *draT* nesses mutantes teve baixo efeito sobre a atividade da nitrogenase;
- c) A deleção cromossomal do domínio GAF de NifA resultou em uma estirpe de fenótipo Nif<sup>-</sup>, sugerindo falha transcricional ou de estabilidade da proteína produzida;
- d) A inserção da mutação pontual C1040T no genoma da FP2 de *A. brasilense*, que codifica para a substituição P347L em GS, foi capaz de gerar atividade constitutiva de nitrogenase e excreção de amônio, justificando a origem do fenótipo descrito para a estirpe HM053;
- e) A mutagênese de regiões responsáveis por codificar o domínio N-terminal de GlnE e do domínio HD de GlnD no genoma de *A. brasilense*, com a concomitante alteração de suas atividades AR e UR, respectivamente, foi capaz de perturbar a hierarquia de regulação dos genes *nif* e gerar excreção de amônio a níveis milimolares;
- f) A combinação de mutações que reduzem a atividade de GS com mutações pontuais ativadoras de NifA gerou estirpes mutantes contendo expressão não-regulada de transcritos de NifH, maximizando a atividade da nitrogenase;
- g) Os duplo-mutantes excretadores de amônio produzidos neste estudo demonstraram apresentar menor penalidade de crescimento e dependência de suplementação de glutamina em relação à estirpe *glnAP347L*, o que pode ser vantajoso do ponto de vista de maior competitividade em campo e performance como biofertilizantes nitrogenados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBHAI, M.; VILAFRANCA, J. J. Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Biochemistry**, v. 33, p. 682-686, 1994.
- ALMASSY, R. J.; JANSON, C. A.; HAMLIN, R., *et al.* Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. **Nature**, v. 323, p. 304-309, 1986.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W., *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMBROSIO, R.; ORTIZ-MARQUEZ, J. C. F.; CURATTI, L. Metabolic engineering of a diazotrophic bacterium improves ammonium release and biofertilization of plants and microalgae. **Metabolic Engineering**, v. 40, p. 59-68, 2017.
- ANANDHAM, R.; HEO, J.; KRISHNAMOORTHY, R., *et al.* *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, p. 1369-1375, 2019.
- ANDRADE, S. L. A.; DICKMANN, A.; FICNER, R., *et al.* Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 14994-14999, 2005.
- ANTONYUK, L. P. Glutamine synthetase of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense*: specific features of catalysis and regulation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 244-249, 2007.
- APOLONIO, T. M. **Caracterização de estirpes de *Azospirillum brasilense* contendo proteína NifA deletada no domínio GAF**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil.
- ARAUJO, L. M.; HUERGO, L. F.; INVITTI, A. L., *at al.* Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 289-294, 2008.
- ARAUJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M., *et al.* GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 491-495, 2004.
- 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. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 4830-4838, 1996.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 339-343, 1999.
- BALI, A.; BLANCO, G.; HILL, S., *et al.* Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1711-1718, 1992.
- BARNEY, B. M.; EBERHART, L. J.; OHLERT, J. M., *et al.* Gene deletions resulting in increased nitrogen release by *Azotobacter vinelandii*: application of a novel nitrogen biosensor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 4316-4328, 2015.

BATCHELOR, J. D.; LEE, P. S.; WANG, A. C., *et al.* Structural mechanism of GAF-regulated  $\sigma^{54}$  activators from *Aquifex aeolicus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 156-170, 2013.

BATISTA, M. B.; DIXON, R. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, p. 603-614, 2019.

BATISTA, M. B.; BRETT, P.; APPIA-AYME, C. *et al.* Disrupting hierarchical control of nitrogen fixation enables carbon-dependent regulation of ammonia excretion in soil diazotrophs. **PLOS Genetics**, v. 17, 2021.

BENDER, R. A.; JANSSEN, K. A.; RESNICK, A. D., *et al.* Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 129, n. 2, p. 1001–1009, 1977.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M., *et al.* Purification, characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB e GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 293-299, 2007.

BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 203-214, 2002.

BLOCH, S. E.; CLARK, R.; GOTTLIEB, S. S. Biological nitrogen fixation in maize: optimizing nitrogenase expression in a root-associated diazotroph. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, p. 4591-4603, 2020b.

BLOCH, S. E.; RYU, M-H.; OZAYDIN, B., *et al.* Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 62, p. 181-188, 2020a.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUREN, S.; RUBIO, L. M. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, 2008.

BUSH, M.; GHOSH, T.; TUCKER, N., *et al.* Nitric oxide-responsive interdomain regulation targets the  $\sigma^{54}$ -interaction surface in the enhancer binding protein NorR. **Molecular Microbiology**, v. 77, p. 1278–1288, 2010.

CABAN, C. E.; GINSBURG, A. Glutamine synthetase adenylyltransferase from *Escherichia coli*: purification and physical and chemical properties. **Biochemistry**, v. 15, p. 1569 -1580, 1976.

CANNON, F. C.; DIXON, R.; POSTGATE, J. R., *et al.* Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 227–239, 1974.

CASSAN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V., *et al.* Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. **Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management**, 2011.

CHAGAS, V. S. **Análise de SNP's do genoma da estirpe HM053 de *Azospirillum brasilense*, utilizando sequenciamento de nova geração.** 42f. Monografia (Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CHAI, L; ZHU, P.; CHAI, J., *et al.* AlphaFold Protein structure database for sequence-independent molecular replacement. **Crystals**, v. 10, 1227, 2021.

CHAN, W.-T.; VERMA, C. S.; LANE, D. P., *et al.* A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 130-132, 1962.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VAN VEEN, J. A. Nitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* in soil and rhizosphere under controlled environmental conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, p. 100– 106, 1991.

DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E., *et al.* 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. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 72-77, 1997.

DELANO, W. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter on protein crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.

DE ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Molecular and General Genetics**, v. 224, p. 421-430, 1990.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2507-2515, 1993.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G. *et al.* Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143–4149, 1996.

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

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 127, p. 285-294, 1966.

DITTA, G.; STANFIELD, D.; CORBIN, D., *et al.* Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7347-7451, 1980.

DIXON, R.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T., *et al.* Regulation of *nif* gene expression in free-living diazotrophs: recent advances. **Biological nitrogen fixation in the 21st century**. Kluwer Academic Publisher, v. 31, p. 87-92, 1997.

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

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A., *et al.* Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.

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

DUVAL, S.; DANYAL, K.; SHAW, S., *et al.* Electron transfer precedes ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 41, p. 16414-16419, 2013.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 3013-3030, 1996.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G., *et al.* *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.17-26, 2001.

EISENBERG, D. S.; GILL, H. S.; PFLUEGL, G. M. U., *et al.* Structure-function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p.122-145, 2000.

ERISMAN, J. W.; GALLOWAY, J.; SEITZINGER, S., *et al.* Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 3, p. 281-290, 2011.

ERISMAN, J. W.; SUTTON, M. A.; GALLOWAY, J., *et al.* How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, v. 1, p. 636-639, 2008.

EUZEBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592, 1997.

EVANS, R.; O'NEILL, M.; PRITZEL, A., *et al.* Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. Preprint em **bioRxiv**: <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034> (2021).

FADEL-PICHETH, C.; SOUZA, E.; RIGO, L., *et al.* Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281-288, 1999.

FERREIRA, N. S.; SANT'ANNA, F. H.; REIS, V. M., *et al.* Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 6203-6212, 2020.

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. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 5, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-386, 1994.

FLASHNER, Y.; WEISS, D. S.; KEENER, J., *et al.* Constitutive forms of the enhancer-binding protein NtrC: evidence that essential oligomerization determinants lie in the central activation domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 249, p. 700-713, 1995.

FORCHHAMMER, K. Glutamine signalling in bacteria. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 358-370, 2007.

FOWLER, N. J.; WILLIAMSON, M. P. The accuracy of protein structures in solution determined by AlphaFold and NMR. **Structure**, v. 30, p. 925-933, 2022.

GALLOWAY, J. N.; ABER, J. N.; ERISMAN, J.W., *et al.* The nitrogen cascade. **Bioscience**, v. 53, n. 4, p. 341-356, 2003.

GAY, P., LE COQ, D., STEINMETZ, M., *et al.* Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 153, p. 1424-1431, 1983.

GERHARDT E. C.; ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, R. R., *et al.* Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signalling. **Microbiology**, v. 158, p. 1656-1663, 2012.

GIBSON, D. G., YOUNG, L., CHUANG, R.-Y., *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, p. 343-345, 2009.

GONZALEZ, V.; OLVERA, L.; SOBERON, X., *et al.* *In vivo* studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 55-67, 1998.

HAUER, Vanessa. Sequenciamento do gene *glnA* das estirpes mutantes HM14, HM26, HM053 e HM210 de *Azospirillum brasilense*. 49f. Monografia (Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

HARRIS, D. F.; LUKOYANOV, D. A.; SHAW, S., *et al.* Mechanism of N<sub>2</sub> reduction catalyzed by Fe-nitrogenase involves reductive elimination of H<sub>2</sub>. **Biochemistry**, v. 57, p. 701-710, 2018.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y., *et al.* Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041-4062, 2014.

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

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 251-283, 2013.

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. *et al.* Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters**, v. 580, n. 22, p. 5232-5236, 2006b.

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

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

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R., *et al.* Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 33-40, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

IPATA, P. L.; PESI, R. What is the true nitrogenase reaction? A guided approach. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 142–144, 2015.

JIANG, P.; ATKINSON, M. R.; SRISAWAT, C., *et al.* Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. **Biochemistry**, v. 39, p. 13433-13449, 2000.

JIANG, P.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge *in vitro*. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 12979–12996, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Reconstitution of *Escherichia coli* glutamine synthetase adenylyltransferase from N-terminal and C-terminal fragments of the enzyme. **Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 415-423, 2009.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1906-1911, 1999.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12782-12794, 1998.

JIANG, P.; PIOSZAK, A. A.; NINFA, A. J. Structure-function analysis of glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 46, p. 4117-4132, 2007.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; ATKINSON, M. R., *et al.* Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 4342-4353, 1997b.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A. J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed *in vitro* from wild-type and mutant subunits. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 4354–4360, 1997c.

JONSSON, A.; NORDLUND, S. *In vitro* studies of the uridylylation of the three PII protein paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: the transferase activity of *R. rubrum* GlnD is regulated by  $\alpha$ -ketoglutarate and divalent cations but not by glutamine. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3471-3478, 2007.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A., *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, p. 583-589, 2021.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 4976-4980, 1988.

KHADEMI, S.; STROUD, R. M. The Amt/MEP/Rh Family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. **Physiology**, v. 21, p. 419-429, 2006.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D., *et al.* *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 679–693, 1989.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M., *et al.* Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 2, p. 87–100, 1985.

KLOSE, K. E.; NORTH, A. K.; STEDMAN, K. M., *et al.* The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 241, p. 233-245, 1994.

KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T.; TOPF, M., *et al.* Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) – Round XIV. **Proteins**, v. 89, p. 1607-1617, 2021.

KUMAR, S.; STECHER, V.; LI, M., *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

KURIHARA, S.; ODA, S.; TSUBOI, Y., *et al.*  $\gamma$ -Glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 19981-19990, 2008.

LANCASTER, K. M.; ROEMELT, M.; ETTENHUBER, P., *et al.* X-ray emission spectroscopy evidences a central carbon in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 974-977, 2011.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E. *et al.* *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2832–2837, 2010.

LEBAUER, D. S.; TRESEDER, K. K. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. **Ecology**, v. 89, n. 2, p. 371–379, 2008.

LEBAUER, D. S.; TRESEDER, K. K. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. **Ecology**, v. 89, n. 2, p. 371-379, 2008.

LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 240, p. 188-196, 1993.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 2735-2744, 1991.

LIANG, S. H.; EISENBERG, D. Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. **Biochemistry**, v.33, p.675–681, 1994.

LIN, H-P.; REEVES, H. C. Purification and characterization of NADP<sup>+</sup>-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 22, p. 371-376, 1991.

LIN, S.-Y., HAMEED, A., LIU, Y.-C., HSU, Y.-H., LAI, W.-A., SHEN, F.-T., YOUNG, C.-C. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 4601-4607, 2015.

LIN, S.-Y., LIU, Y.-C., HAMEED, A. *et al.* *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p. 1453-1458, 2016.

LIN, S.-Y.; LIU, Y.-C.; HAMEED, A. *et al.* *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3762-3768, 2013.

LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T.; YOUNG, L.-S. *et al.* *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1185-1190, 2012.

LIN, S.-Y.; YOUNG, C.-C.; HUPFER, H.; SIERING, C. *et al.* *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 761-765, 2009.

LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28711-28718, 2003.

MACHADO, H. B. **Isolamento e caracterização de mutantes de *Azospirillum brasilense* constitutivos para fixação de nitrogênio**. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1988.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiol.** v. 37, p. 549-553, 1991.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S., *et al.* The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 674-684, 1995.

MacNEIL T.; MacNEIL D.; TYLER, B. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1302-1313, 1982.

MAGALHAES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M., *et al.* A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 471-430, 1983.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N., *et al.* The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601-610, 2004.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007.

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

McKINLAY, J. B.; HARWOOD, C. S. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 26, p. 11669-11675, 2010.

MILCAMP, A.; VAN DOMMELEN, A.; STIGTER, J., *et al.* The *Azospirillum brasilense* *rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 467-478, 1996.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 352–355, 1972.

MIRDITA, M.; SCHUTZE, K.; MORIWAKI, Y., *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v.19, p. 679–682, 2022.

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

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G., *et al.* *In-trans* regulation of the N-truncated-NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEBS Letters**, v. 180, p. 157-161, 1999b.

MORETT, E.; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognizes the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 24, p. 11469-11488, 1988.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y., *et al.* The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279-286, 2013.

NINFA, A. J.; BENNETT, R. L. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 6888-6893, 1991.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S., *et al.* Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7024-7032, 1993.

NISHIKAWA, C. Y. **Expressão e caracterização de uma forma N-truncada da proteína NifA de *Azospirillum brasilense***. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil.

OKON, Y.; HEYTLER, P.; HARDY, W. N<sub>2</sub> fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v. 46, p. 694-697, 1983.

OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F., *et al.* 2-Oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 4797-4809, 2015.

ORTIZ-MARQUEZ, J. C. F.; DO NASCIMENTO, M.; DUBLAN, M. D., *et al.* Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 2345–2352, 2012.

ORTIZ-MARQUEZ, J. C. F.; DO NASCIMENTO, M.; CURATTI, L. Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 154–164, 2014.

PAK, M. A.; MARKHIEVA, K. A.; NOVIKOVA, M. S., *et al.* Using AlphaFold to predict the impact of single mutations on protein stability and function. Preprint em **bioRxiv**: <https://doi.org/10.1101/2021.09.19.460937> (2021).

PANKIEVICZ, V. C. S.; AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N., *et al.* Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, p. 907–919, 2015.

PARTE, A. C.; CARBASSE, J. S.; MEIER-KOLTHOFF, J. P., *et al.* List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5607-5612, 2020.

PEDROSA, F. O.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARAES, V. F. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strains HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PELANDA, R.; VANONI, M. A.; PEREGO, M., *et al.* Glutamate synthase genes of the diazotroph *Azospirillum brasilense*. Cloning, sequencing, and analysis of functional domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 3099-3106, 1993.

PENG, G. X.; WANG, H. R.; ZHANG, G. X. *et al.* *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PIOSZAK, A. A.; JIANG, P.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. **Biochemistry**, v. 39, p. 13450-13461, 2000.

PIROLA, M. C.; MONOPOLI, R.; ALIVERTI, A., *et al.* Isolation and characterization of glutamine synthetase from the diazotroph *Azospirillum brasilense*. **International Journal of Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1749-1754, 1992.

PROBER, J. M.; TRAINOR, G. L.; DAM, R. J., *et al.* A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. **Science**, v. 238, p. 336-341, 1987.

RAY, D. K.; MUELLER, N. D.; WEST, P. C., *et al.* Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. **PLOS One**, v. 8, 2013.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 1979-1983, 1985.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Isolation of the nitrogen assimilation regulator NRI, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 5554-5558, 1983.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I., *et al.* *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa Fusca*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* in *Escherichia coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. **Cell**, v. 45, n. 6, p. 785-792, 1986.

RENDINA, A. R.; ORME-JOHNSON, W. H. Glutamate synthase: the kinetic mechanism of the enzyme from *Escherichia coli* W. **Biochemistry**, v. 17, n. 25, p. 5388-5393, 1978.

REY, F. E.; HEINIGER, E. K.; HARWOOD, C. S. Redirection of metabolism for biological hydrogen production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1665-1671, 2007.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 24, p. 6777-6785, 2002.

ROSNER, B. Fundamentals of Biostatistics. Cengage Learning, 8<sup>o</sup> edição, 2015

SAKAMOTO, N.; KOTRE, A. M.; SAVAGEAU, M. A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 2, p. 775-783, 1975.

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

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L., *et al.* Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5117-5122, 1992.

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

SANT'ANNA, F. H.; TRENTINI, D. B.; WEBER, S. S., *et al.* The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, n. 4, p. 322-336, 2009.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743-767, 2013.

SANTOS, K. F. D. N., MOURE, V. R., HAUER, V., *et al.* Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant Soil**, v. 415, p. 245-255, 2017.

SANTOS, P. C.; FANG, Z.; MASON, S. W., *et al.* Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMS Genomics**, v. 13, 2012.

SCHAFFER, A.; TAUCH, A.; JAGER, W., *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, v.145, p. 69-73, 1994.

SCHNABEL, T.; SATTELY, E. Engineering posttranslational regulation of glutamine synthetase for controllable ammonia production in the plant symbiont *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, 2021a.

SCHNABEL, T.; SATTELY, E. Improved stability of engineered ammonia production in the plant-symbiont *Azospirillum brasilense*. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, p. 2982-2996, 2021b.

SCHOLLHORN, R; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, p. 213-16, 1967.

SEARCHINGER, T.; WAITE, R.; HANSON, C., *et al.* Creating a sustainable food future: a menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050. **World Resources Reports**, 2019.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 701-722, 2009.

SEEFELDT, L. C.; Yang, Z.-Y.; Duval, S., *et al.* Nitrogenase Reduction of Carbon-Containing Compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1827, p. 1102-1111, 2013.

SEEFELDT, L. C.; YANG, Z.-Y.; LUKOYANOV, D. A. Reduction of substrates by nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 12, p. 5082-5106, 2020.

SHIONO, D.; YOSHIDOME, T. AlphaFold-predicted protein structure vs experimentally obtained protein structure: an emphasis on the side chains. **Journal of the physical society of Japan**, v. 91, 064804, 2022.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. **BioTechnology**, v.1, p. 784-791, 1983.

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

SMIL, V. Nitrogen and food production: proteins for human diets. **Ambio**, v. 31, p. 126-131, 2002.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 8690-8695, 1987.

SODERBACK, E.; REYES-RAMIREZ, F.; EYDMANN, T., *et al.* The redox- and fixed nitrogen-responsive regulatory protein NIFL from *Azotobacter vinelandii* comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 179-192, 1998.

SOTOMAIOR, P.; ARAUJO, L. M.; NISHIKAWA, C. Y., *et al.* Effect of ATP and 2-oxoglutarate on the *in vitro* interaction between the NifA GAF domain and the GlnB protein of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 12, p. 1135-1140, 2012.

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. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A., *et al.* Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v. 312, p. 15-23, 2008.

STADTMAN, E. R. The story of glutamine synthetase regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 44357-44364, 2001.

STEFANELLO, A. A. **Regulação da atividade de NifA de *Herbaspirillum seropedicae* por proteínas PII em resposta aos níveis de amônio.** 209 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

STEINEGGER, M.; SÖDING, J. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 1026-1028, 2017.

STEINMETZ, M.; LE COQ, D.; DJEMIA, H. B., *et al.* Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. **Molecular & General Genetics**, v. 191, n. 1, p. 138-144, 1983.

STEVENS, A. O.; HE, Y. Benchmarking the accuracy of AlphaFold 2 in loop structure prediction. **Biomolecules**, v. 12, 985, 2022.

STOKSTAD, E. The nitrogen fix. **Science**, v. 353, p. 1225-1227, 2016.

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

TEJERO, R.; HUANG, Y. J.; RAMELOT, T. A., *et al.* AlphaFold models of small proteins rival the accuracy of solution NMR structures. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 877000, v. 9, 2022.

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 Research**, v. 22, 4673-4680, 1994.

TIAN, Z. X.; LI, Q. S.; BUCK, M., *et al.* The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 911-924, 2001.

TIKHONOVA, E. N.; GROUZDEV, D. S.; KRAVCHENKO, I. K. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, p. 2787-2793, 2019.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S. A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531-539, 2010.

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

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E., *et al.* Cloning and characterization of the *Azospirillum brasilense* *glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 5, p. 813-820, 2002.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J., *et al.* (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2652-2659, 1998.

VAN DOMMELEN, A.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Identification of the glutamine synthetase adenylyltransferase of *Azospirillum brasilense*. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 205-212, 2009.

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENNAR, D., *et al.* An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 133-146, 1996.

VAN HEESWIJK, W. C.; RABENBERG, M.; WESTERHOFF, H. V., *et al.* The genes of the glutamine synthetase adenylylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 443-457, 1993.

VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; BOOGERD, F. C. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 628-695, 2013.

VANONI, M. A.; CURTI, B. Structure-function studies of glutamate synthases: a class of self-regulated iron-sulfur flavoenzymes essential for nitrogen assimilation. **The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 60, p. 287-300, 2008.

VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M., *et al.* AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, p. D439–D444, 2022.

VITORINO, J. C.; STEFFENS, M. B. R.; MACHADO, H. B., *et al.* Potencial roles for the *glnB* and *ntrYX* genes in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, p. 199-204, 2001.

WEISS, D. S.; BATUT, J.; KLOSE, K. E., *et al.* The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. **Cell**, v. 67, p. 155–167, 1991.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A., *et al.* Assimilation of  $^{13}\text{NH}_4^+$  by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 4211-4214, 1987.

WILKINS, M. R.; LINDSKOG, I.; GASTEIGER, E., *et al.* Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool. **Electrophoresis**, v. 18, p. 403-408, 1997.

WISNIEWSKI-DYE, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G., *et al.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLOS genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002430, 2011.

WOOD, C. C.; ISLAM, N.; RITCHIE, R. J., *et al.* A simplified model for assessing critical parameters during associative  $^{15}\text{N}_2$  fixation between *Azospirillum* and wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 969–974, 2001.

WOOLFOLK, C. A.; STADTMAN, E. R. Regulation of glutamine synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 118, n. 3, p. 736–755, 1967.

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

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

YANG, Y.; ZHANG, R.; FENG, J., *et al.* *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, p. 3676-3681, 2019.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v. 33, p. 103–109, 1985.

YIN, R.; FENG, B. Y.; VARSHNEY, A., *et al.* Bench marking AlphaFold for protein complex modelling reveals accuracy determinants. **Protein Science**, 31:e4379, 2022.

YOUNG, C.-C.; HUPFER, H.; SIERING, C. *et al.* *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 959-963, 2008.

ZHANG, T.; YAN Y.; HE, S., *et al.* Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Research in Microbiology**, v. 163, p. 332–339, 2012.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 10, p. 3364–3369, 1992.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; SERATE, J., *et al.* Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 11, p. 2711–2721, 2010.

ZHAO, Z. L.; MING, H.; DING, C. L., *et al.* *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 550-554, 2020.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNECHE, S., *et al.* The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17090-17095, 2004.

ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y. *et al.* *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2618-2624, 2013.

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

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

### S1 – Alinhamento de proteínas com alta similaridade a *AbNifA*

