MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA

Estudo da regulação da atividade da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* em resposta aos níveis de amônio e oxigênio

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Curitiba

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA

Estudo da regulação da atividade da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* em resposta aos níveis de amônio e oxigênio

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Bioquímica.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rose Adele Monteiro
Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Curitiba

2010

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço muito aos meus orientadores Rose Adele e Emanuel pela oportunidade, apoio, paciência e dedicação a mim concedidos. Sou muito grato.

Aos outros professores do núcleo de fixação de nitrogênio pelo apoio. Em especial aos professores Luciano e Leda pela correção dos relatórios e artigos, e ao professor Marcelo Müller pela correção da tese.

Agradeço também a todos os amigos do grupo de fixação de nitrogênio e do departamento de bioquímica por toda a ajuda, apoio, brincadeiras e conversas no cafezinho, fila do RU, entre outros lugares. Não cito nomes para não correr o risco de esquecer de pessoas que foram tão importantes ao longo desses 4 anos.

Ao Bruno e Ana Cláudia que me ajudaram em alguns experimentos e purificações de proteína.

Ao professor Ray Dixon que me recebeu tão bem em Norwich, durante o estágio *sandwich*, e com quem tive a oportunidade de aprender muito sobre muitas coisas. A todos os amigos que fiz em Norwich: Matt Bush, Peter Slavny, Richard Little, Ardi Nasarwanji, Wei Chin e Yez Kadyakale, que me proporcionaram dias inesquecíveis.

Agradeço aos meus pais, por terem sempre sido exemplo e pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida. Em especial, pelo incentivo ao estudo, que me fez chegar até aqui.

À Rosana, pela presença sempre tão preciosa em minha vida que tanto ajuda a superar dificuldades e conquistar coisas.

Aos técnicos do laboratório de fixação de nitrogênio, Valter e Roseli, por nunca terem negado ajuda e sempre trabalharam muito para ajudar a todos.

À coordenação de pós-graduação em bioquímica pelo trabalho constante para permitir nossa formação.

Ao CNPq e outras agências financiadoras pela bolsa e suporte ao desenvolvimento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS IV
LISTA DE TABELAS VI
LISTA DE ABREVIATURAS VII
RESUMO IX
ABSTRACT X

1. Introdução **1**
1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio 1
1.1.1 Complexo enzimático da nitrogenase 2
1.2 Assimilação de nitrogênio 5
1.3 Captação de amônio 5
1.4 Controle do metabolismo de nitrogênio pelo sistema Ntr 6
1.4.1 Ligação de moléculas efetoras às proteínas PII 9
1.5 Ativação da transcrição σ^{54} dependente 10
1.5.1Ativadores de transcrição dependentes de σ^{54} 13
1.6 Proteína NifA 18
1.6.1 Estrutura e Função dos domínios da proteína NifA 18
1.6.2 Controle da atividade da proteína NifA 21
1.6.2.1Controle da atividade da proteína NifA nas γ-proteobactérias 21
1.6.2.2 Controle da atividade da proteína NifA nas α e β-proteobactérias 25
2. Justificativa **29**
3. Objetivos **30**
3.1 Objetivos gerais 30
3.2 Objetivos específicos 30
4. Materiais e métodos **31**
4.1 Bactérias e Plasmídeos 31
4.2 Meios de Cultura 33
4.3 Antibióticos 34
4.4 Transformação bacteriana 35
4.4.1 Transformação bacteriana por eletroporação 35
4.4.2 Transformação bacteriana por choque térmico 34
4.5 Purificação do DNA plasmidial 36
4.6 Eletroforese de DNA 37
4.7 Ativação da transcrição *in vivo* 37
4.7.1 Atividade de β-galactosidase 38

4.8 Quantificação de proteínas 39
4.9 Eletroforese de Proteínas 39
4.9.1 Eletroforese desnaturante Tris-Glicina-SDS 39
4.9.2 Eletroforese desnaturante Tris-Tricina-SDS 40
4.9.3 Eletroforese em condições não desnaturantes 40
4.10 Purificação de proteínas 41
4.10.1 Purificação da proteína $NifA_{(202-542)}$ e suas variantes mutantes e do domínio GAF da proteína NifA 41
4.10.2 Purificação da proteína GlnK de *H. seropedicae* 42
4.10.3 Purificação da Proteína $NifA_{(202-542)}$ em anaerobiose 42
4.11 Uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* 43
4.12 Marcação radioisotópica da região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* com [^{32}P] 43
4.13 Ligação das variantes de NifA aos seus sítios de ligação na região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* 44
4.14 Análise da interação entre o domínio GAF da proteína NifA de *H. seropedicae* e a proteína GlnK através de ensaios de tripsinólise limitada 44
4.15 Determinação das constantes de dissociação da proteína GlnK de *H. seropedicae* e os efetores 2-OG, ATP e ADP 45
4.16 Medições de Dicroísmo Circular (CD) 45
5. Resultados e Discussão 47
5.1 Efeito do oxigênio na atividade *in vivo* das proteínas quiméricas NifAQ1 e NifAQ2 47
5.2 Atividade de ligação ao promotor *nifB* das proteínas $NifA_{(202-542)}$C414S, $NifA_{(202-542)}$C426S, $NifA_{202-542)}$C446S e $NifA_{202-542)}$C451S 49
5.3 Purificação da proteína $NifA_{(202-502)}$ de *H. seropedicae* em atmosfera livre de oxigênio 52
5.4 Análise espectrofotométrica da proteína $NifA_{(202-542)}$ parcialmente purificada em anaerobiose 53
5.5 Interação *in vitro* entre o domínio GAF da proteína NifA e a proteína GlnK de *H. seropedicae* 55
5.6 Efeito dos efetores ATP, ADP e 2-OG na estrutura secundária da proteína GlnK de *H. seropedicae* 69
5.7 Determinação das constantes de ligação de ATP, ADP e 2-OG da proteína GlnK de *H. seropedicae* 72
6. Conclusões 81
7. Referências Bibliográficas 83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e ciclo catalítico do complexo enzimático da Nitrogenase de *A. vinelandii* 4
Figura 2 - Modelo esquemático da ativação da transcrição σ^{54} dependente..... 12
Figura 3 - Modelo estrutural do domínio AAA+ da proteína PspF de *E. coli* 14
Figura 4 - Modelo estrutural de hexâmero ativo de NtrC de *Salmonella typhimurium*. 15
Figura 5 - Modelo estrutural do contato entre o hexâmero de PspF de *E. coli* e σ^{54} baseado em mapa de densidade eletrônica 17
Figura 6 - Modelo esquemático dos domínios modulares da proteína NifA de *H. seropedicae* e alinhamento do motivo conservado de cisteínas 19
Figura 7 - Modelo esquemático das proteínas quiméricas NifAQ1 e NifAQ2 47
Figura 8 - Ligação das proteínas NifA mutantes ao promotor *nifB in vitro* 50
Figura 9- Purificação parcial da proteína $NifA_{(202-542)}$ de *H. seropedicae* em atmosfera livre de oxigênio..... 53
Figura 10 - Espectro de absorção de luz da proteína $NifA_{(202-542)}$ de *H. seropedicae* parcialmente purificada em atmosfera livre de oxigênio 54
Figura 11 - Efeito do domínio GAF na cinética de degradação proteolítica e da proteína GlnK 57
Figura 12 - Efeito da proteína NifA de *A. vinelandii* na cinética de degradação proteolítica e da proteína GlnK..... 59
Figura 13 - Efeito do domínio GAF na cinética de degradação proteolítica e da proteína GlnK-UMP_3 60
Figura 14 - Efeito de ATP, ADP e 2-OG na extensão da digestão proteolítica das proteínas GlnK e GlnK-UMP_3 de *H. seropedicae*..... 63
Figura 15 - Efeito de ATP, ADP e 2-OG na extensão da digestão proteolítica do domínio GAF na presença da proteína GlnK..... 64
Figura 16 - Efeito de ATP, ADP e 2-OG na extensão da digestão proteolítica do domínio GAF na presença da proteína GlnK -UMP_3..... 65
Figura 17 - Modelo da regulação da Proteína NifA de *H. seropedicae* por amônio 68
Figura 18 -Espectro de CD da proteína GlnK de *H. seropedicae* na presença dos efetores moleculares..... 70
Figura 19 - Estabilidade térmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* na presença dos efetores moleculares 71
Figura 20 - Titulação Isotérmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* com ATP 74
Figura 21 - Titulação Isotérmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* com ADP..... 75
Figura 22 - Titulação Isotérmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* com 2-OG 76

Figura 23 -Titulação Isotérmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* com 2-OG na presença de ATP 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias e Plasmídeos 31
Tabela 2 – Efeito do oxigênio na atividade das proteínas NifAQ1 e NifAQ2 48
Tabela 3 -Parâmetros termodinâmicos da ligação de ATP, ADP e 2-OG na proteína GlnK de *H. seropedicae*..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG – 2-Oxoglutarato

AAA+ - ATPases associadas com várias atividades celulares

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

Amp –resistência a ampicilina

ATase – Enzima adenililtransferase

ATP – Adenosina trifosfato

CD – do inglês, *Circular Dichroism* (Dicroísmo circular)

Cm –resistência a Cloranfenicol

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – 5'-trifosfato de 2'desoxinucleotídeos

DO_{600} – Densidade ótica a 600 nanomêtros

EDTA – Ácido etilenodiamino-tetra-acético

EBP – proteína que se liga a um *enhancer*

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

FeMo-co – Cofator ferro molibdênio

GDH – Glutamato desidrogenase

GOGAT – Glutamato Sintase

GS - Glutamina Sintase

His – Aminoácido Histidina

HTH – do inglês, *Helix Turn Helix*

IPTG - β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo

ITC – do inglês, *isotermal titration calorimetry*

kΩ - Quilo Ohms

kb – Quilobase

K_d – Constante de dissociação

kDa – Quilo Daltons

Km –resitência a canamicina

kV – Quilo Volts

ONPG – o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RBS – sítio de ligação para ribossomo

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

TRIS – Tris(hidroximetil)-aminometano

Tm – Temperatura de *melting*

Tyr – Aminoácido Tirosina

UAS – Seqüência regulatória a montante

UMP – Uridina monofosfato

UV – Radiação ultra-violeta

ΔH – Variação de Entalpia

ΔS – Variação de Entropia

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio capaz de se associar a plantas com interesse econômico. A proteína NifA desse organismo é responsável por regular a síntese das proteínas de estrutura e montagem do complexo enzimático da nitrogenase. A atividade da proteína NifA é regulada por dois sinais ambientais: oxigênio molecular e nitrogênio fixado. O sítio de sensibilidade ao oxigênio é provavelmente um motivo de cisteínas, que é conservado apenas em proteínas NifA sensíveis ao oxigênio. A sensibilidade ao nitrogênio fixado está relacionada com a inibição da atividade da proteína pelo seu domínio N-terminal GAF. O exato mecanismo de inibição da atividade da proteína NifA por esses dois sinais ambientais ainda é desconhecido. O presente trabalho teve por objetivo fornecer dados que auxiliem o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae*. Para esclarecer o papel do motivo conservado de cisteínas da proteína NifA, a atividade de ligação ao DNA *in vitro* de uma série de mutantes pontuais neste motivo foi testada. Esse experimento demonstrou que esse motivo não está relacionado com a ligação da proteína ao DNA promotor. Com o emprego de proteínas quiméricas observou-se que o domínio N-terminal GAF da proteína NifA de *H.seropedicae* não está relacionado com a sensibilidade ao oxigênio, mas sim com nitrogênio fixado. Além disso, foi demonstrado que a proteína GlnK é responsável por transduzir os níveis de nitrogênio fixado para o domínio N-terminal GAF por interação direta proteína-proteína. A avaliação do efeito de efetores metabólicos na formação do complexo GAF/GlnK mostrou que o aumento na concentração de 2-OG pode desestabilizá-lo. Foi avaliado ainda o efeito dos efetores metabólicos na estrutura secundária da proteína GlnK. Utilizando a técnica de ITC foi possível determinar as constantes de afinidade da proteína GlnK de *H. seropedicae* pelos efetores metabólicos. Com os resultados aqui apresentados foi possível elaborar um modelo de regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* pelos níveis de nitrogênio fixado e melhorar o entendimento sobre o papel do motivo conservado de cisteínas na atividade da proteína.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a nitrogen fixing bacterium capable of associating with economically interesting crops. The *H. seropedicae* NifA protein is responsible to regulate the synthesis of proteins of nitrogenase enzymatic complex structure and assembly. The NifA activity is regulated by two environmental signals: molecular oxygen and fixed nitrogen. The site of oxygen sensitivity is probably a cysteine motif, which is conserved only in oxygen sensible NifA proteins. The sensitivity to fixed nitrogen is related with protein inhibition by its N-terminal GAF domain. The exact mechanism of protein activity inhibition by these two environmental signals is still not clear. This thesis aimed data to allow the understanding of the mechanisms involved in *H. seropedicae* NifA activity. To clarify the role of the conserved cysteine motif, *in vitro* DNA-binding activity of a series of point mutants was evaluated. This assay showed that the conserved cysteine motif is not related to the promoter DNA binding. By using chimeric proteins, it was observed that the N-terminal GAF domain of *H. seropedicae* NifA protein is not related to oxygen sensitivity, but it is related to fixed nitrogen. Furthermore, was demonstrated that GlnK protein is the transducer of the levels of fixed nitrogen to the N-terminal GAF by a direct protein-protein interaction. The evaluation of the effect of metabolic effectors in the GAF/GlnK complex formation showed that increase on the 2-OG levels can destabilize it. Also, it was evaluated the effect of the effectors on the secondary structure of GlnK protein. By using the ITC methodology it was possible to determine the affinity constants of *H. seropedicae* GlnK protein by the metabolic effectors. With the results showed here it was possible to create a model of NifA activity regulation by fixed nitrogen and improve the understanding of the role of the conserved cysteine motif on the protein activity.

1.Introdução

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi isolada inicialmente de rizosfera e superfície de plantas de milho, arroz e sorgo (Baldani *et al.*, 1984). Posteriormente *H. seropedicae* também foi encontrado colonizando bananeira e abacaxizeiro (Cruz *et al*, 2001). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, vibrióde, com grande motilidade quando em concentrações de oxigênio próximas das encontradas no ambiente natural. *H. seropedicae* pertence à classe das Proteobactérias e é capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano aparente para o hospedeiro, sendo por isso considerado endofítico (Olivares *et al*, 1997).

H. seropedicae é um organismo diazotrófico, ou seja, é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio. Esse fato, combinado com a capacidade que *H. seropedicae* tem de produzir fitohormônios (Bastian *et al.*, 1998), faz com que essa bactéria tenha potencial como um promotor de crescimento vegetal. Gyaneshwar e colaboradores (2002) mostraram que plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae* tinham um aumento no peso seco (22% a 50%), conteúdo total de Carbono (15% a 50%) e conteúdo total de Nitrogênio (29% a 85%) 30 dias após a inoculação. Em outro trabalho, a inoculação simultânea de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp.em cana-de-açúcar micropropagada ocasionou um aumento da biomassa total da planta, o que levou os autores a sugerir que a utilização dessas bactérias poderia mitigar consideravelmente a aplicação de fertilizante nitrogenado na cultura de cana-de-açúcar (Muthukumarasamy *et al*, 2006). Portanto, *H. seropedicae* tem um grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante em substituição a fertilizantes nitrogenados, já que é capaz de se associar a plantas de interesse econômico e promover seu crescimento.

1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio atmosférico (N_2) não é assimilável pela maioria dos organismos vivos. Apenas um pequeno grupo de procariotos, denominados diazotrofos, é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio. Os procariotos fixadores de nitrogênio são distribuídos entre Bactéria e Archea,

sendo um grupo com uma alta biodiversidade (Zehr et al, 2003). O nitrogênio atmosférico convertido em formas mais reativas pelos diazotrofos é assimilável por outros organismos, o que faz com que o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio seja fundamental no ciclo biogeoquímico do Nitrogênio.

A redução do nitrogênio atmosférico a amônio é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. A estequiometria dessa redução é mostrada abaixo (Simpson e Burris, 1984):

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16\ ATP.Mg^{2+} \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ ADP.Mg^{2+} + 16\ Pi$$

1.1.1 Complexo enzimático da nitrogenase

Os produtos dos genes *nif* são responsáveis pela estrutura, montagem e biossíntese do complexo enzimático da nitrogenase (Merrick, 1992). Esse complexo consiste em duas proteínas que podem ser purificadas separadamente: a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase (Bulen & Le-comte, 1966; Hageman & Burris, 1978). A dinitrogenase, também conhecida como proteína MoFe ou componente I, é um tetrâmero com 220 a 240 KDa, do tipo $\alpha_2\beta_2$, formado pelos produtos dos genes *nifD* e *nifK* respectivamente. Esse tetrâmero contem 2 pares de metaloclusters, conhecidos como cluster-P e cofator ferro molibdênio (FeMo-co) (Mayer *et al*, 1999; Shah & Brill, 1977). FeMo-co é composto por homocitrato e um cluster $MoFe_3$-S_3 ligado a um cluster Fe_4-S_3 por três enxofres ligantes. O átomo de molibdênio é coordenado com o C-2 carboxílico e a hidroxila do homocitrato. O cluster-P é um cluster [8Fe-7S] com uma estrutura similar à do FeMo-co, que consiste em dois clusters [4Fe-3S] conectados por um átomo de enxofre central. O cluster-P está localizado na interface das subunidades NifK e NifD e é coordenado por resíduos cisteinil das duas subunidades (Corbett *et al*, 2004).

A dinitrogenase redutase, também conhecida como proteína Fe ou componente II, é um homodímero com cerca de 60 KDa, formado pelo produto do gene *nifH*. Esse dímero contém um único cluster [4Fe-4S] na interface das subunidades e dois sítios de ligação para Mg-ATP, um em cada subunidade (Ryle *et al*, 1996; Schlessman *et al*, 1998; Jang *et al*, 2000).

No ciclo de redução do nitrogênio atmosférico a proteína Fe liga duas moléculas de MgATP (Howard & Rees, 1994). Nesse estado a proteína Fe se associa à proteína MoFe. Durante a associação, as duas moléculas de MgATP são hidrolisadas a MgADP e um único elétron é transferido da proteína Fe para a proteína MoFe; o elétron é transferido do cluster [4Fe-4S] da proteína Fe para o cluster-P da proteína MoFe, e então para o FeMo-co, que é o sítio da redução do nitrogênio (Christiansen & Dean, 2001; Burgess & Lowe, 1996). A proteína Fe associada a MgADP dissocia da proteína MoFe e precisa ser regenerada. O processo de regeneração consiste no desligamento de MgADP e ligação de MgATP. A proteína Fe é novamente reduzida e se associa a MoFe, completando o ciclo (Hageman & Burris, 1978). Esse ciclo é repetido oito vezes, até que a redução esteja completa (Seefeldt *et al*, 2009). A Figura 1 mostra um esquema do ciclo de redução da proteína Fe.

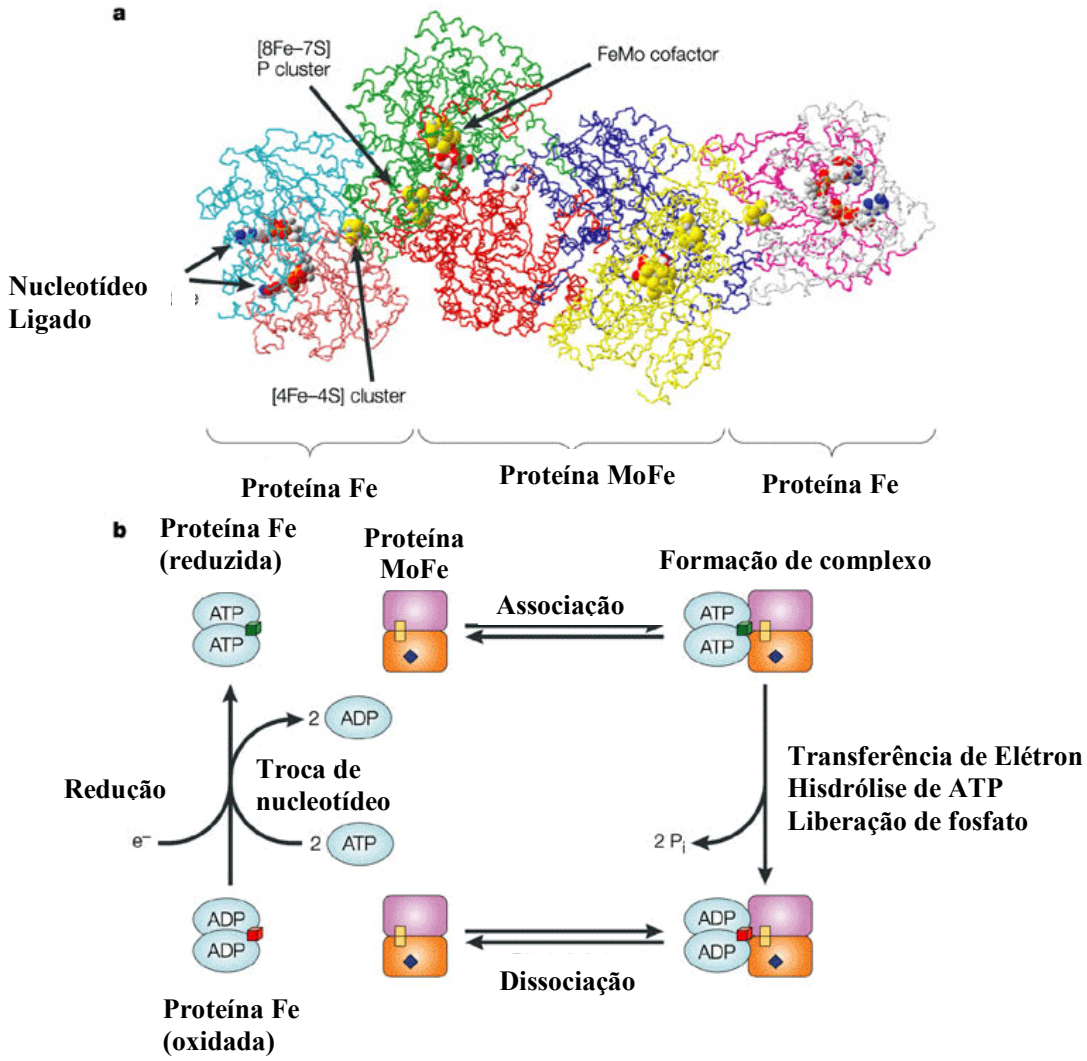


FIGURA 1 – ESTRUTURA E CICLO CATALÍTICO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE DE *Azotobacter vinelandii.* (a) Estrutura do complexo cristalográfico formado pelas proteínas Fe e MoFe estabilizado pelo análogo do estado de transição de hidrólise ATP – AlF_4. (b) Esquema do ciclo de redução da proteína Fe. A proteína Fe é apresentada em azul e FeMo em rosa e laranja. (Adaptado de Dixon & Kahn, 2004).

1.2 Assimilação de nitrogênio

Os aminoácidos glutamato e glutamina são moléculas chave na utilização de nitrogênio pela célula, funcionando como doadores de nitrogênio para muitas reações biossintéticas (Merrick & Edwards, 1995). Existem duas grandes vias de assimilação de amônia em *Escherichia coli*: a via da enzima glutamato desidrogenase (GDH) e a via da enzima glutamina sintetase (GS), que é codificada pelo gene *glnA*. Quando a amônia é assimilada via GS, a glutamina sintetizada é transformada em glutamato, em uma reação catalisada pela glutamato sintase (GOGAT) (Reitzer, 2003):

$$\alpha\text{-cetoglutarato} + NH_3 + NADPH \xrightarrow{GDH} \text{glutamato} + NADP^+$$

$$\text{glutamato} + ATP + NH_3 \xrightarrow{GS} \text{glutamina} + ADP + PO_4^{2-}$$

$$\text{glutamina} + \alpha\text{-cetoglutarato} + NADPH \xrightarrow{GOGAT} 2\ \text{glutamato} + NADP^+$$

Em *E. coli*, a via GS-GOGAT, que consome ATP, é utilizada em ambientes ricos em energia, enquanto que a via GDH é empregada em ambientes com quantidades limitantes de energia (Helling, 1998; Helling, 1994). A via GS-GOGAT é mais apropriada para assimilação em um meio com concentrações limitantes de nitrogênio, tendo em vista que GS tem um K_m muito menor para amônia do que GDH (Reitzer, 2003).

1.3 Captação de amônio

O amônio é uma base fraca e, em pH fisiológico, a maior parte das moléculas permanece na forma do íon NH_4^+. Em altas concentrações de amônio no ambiente (tipicamente acima de 1 mmol/L), ocorre difusão simples da forma não carregada suficiente para promover o crescimento celular (Zheng *et al*, 2004). No entanto, em baixas concentrações de amônio, é importante que haja um mecanismo de captação ativa de amônio, para manter o nitrogênio fixado dentro da célula.

Uma proteína transportadora de amônio de alta afinidade, da família Amt/Mep, foi identificada inicialmente em *Saccharomyces cerevisae* e *Arabidopsis thaliana* (Marini *et al*, 1994; Ninnemann *et al*, 1994). Após isso, esses transportadores foram identificados em todos os três domínios dos seres vivos (Thomas *et al*, 2000b). Em muitas bactérias já se sabe que os transportadores dessa família são importantes na captação de amônio ou metilamônio, entre elas *Corynebacterium glutamicum* (Siewe *et al*, 1996), *Azospirillum brasilense* (Van Dommelen *et al*, 1998), *Azorhizobium caulinodans* (Michel-Reydellet & Kaminski, 1999), *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al*, 1998), *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Montesinos *et al*, 1998), *E. coli* (Soupene *et al*, 1998), *Klebsiella pneumoniae* (Jack *et al*, 1999) e *H. seropedicae* (Noindorf *et al*, 2005).

Em muitos casos, a presença de altas concentrações de amônio no ambiente extracelular inibe a atividade do transportador e, em *E. coli*, a atividade do transportador está sob controle do sistema Ntr (Jayakumar *et al*, 1989; Merrick & Edwards, 1995).

Quase todas as bactérias e arquéias codificam pelo menos uma proteína Amt e, normalmente, o gene estrutural *amtB* forma um operon com o gene *glnK*, formando um operon (Thomas *et al*, 2000a).

1.4 Controle do metabolismo de nitrogênio pelo sistema Ntr

O sistema Ntr controla a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos pela bactéria (Merrick & Edwards, 1995). O sistema foi inicialmente descrito em *E. coli* como sendo composto por seis proteínas, no entanto hoje considera-se que seja constituído por oito proteínas: O sistema de dois componentes NtrB-NtrC (produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*); as proteínas do tipo PII (GlnB e GlnK) (produtos dos genes *glnB* e *glnK*); as enzimas bifuncionais GlnD e GlnE (produtos dos genes *glnD* e *glnE*), a enzima glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*) e a proteína de membrana AmtB (produto do gene *amtB*). O sistema Ntr descrito aqui corresponde ao modelo encontrado para *E. coli*.

A proteína GlnB tem um papel central no sistema Ntr. Essa proteína forma homotrímeros e tem sua atividade regulada por uridililação/desuridililação, que

por sua vez é catalisada pela enzima GlnD (Adler *et al*, 1975). Em condições limitantes de nitrogênio, GlnD tem sua atividade uridilil-transferase estimulada, e adiciona grupamentos UMP a GlnB. Em ambiente rico em nitrogênio a concentração de glutamina na célula é aumentada; com isso a atividade removedora de uridilil de GlnD é estimulada, favorecendo a desuridililação de GlnB (Adler *et al*, 1975; Kamberov *et al*1995). A regulação exercida por GlnB nesse sistema está relacionada com a capacidade dessa proteína interagir com proteínas alvo e regular a atividade das mesmas (Reitzer, 2003).

A molécula efetora da regulação transcricional exercida pelo sistema Ntr é o ativador transcricional NtrC. Trata-se de uma proteína dimérica, na qual cada subunidade possui massa molecular em torno de 55 KDa (Merrick & Edwards, 1995). NtrC faz parte do grupo de proteínas ativadoras de transcrição dependentes de σ^{54} (Kustu *et al*, 1989; Morett & Segovia, 1993). Como é característico nesse grupo de proteínas ativadoras de transcrição, NtrC possui três domínios distintos: o N-terminal, com uma atividade regulatória, o central, que é o domínio catalítico, interage diretamente com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase e possui um sítio de ligação de ATP, e o C-terminal que possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA (Drummond *et al*, 1986).

Apenas NtrC fosforilada é capaz de ativar a transcrição a partir de promotores alvo. A fosforilação parece não estar relacionada com a ligação de NtrC ao DNA, mas sim à oligomerização dos dímeros de NtrC (Reitzer, 2003). Os genes que tem sua transcrição ativada por NtrC incluem *glnA, ntrBC*, *glnHPQ* (envolvidos no transporte da glutamina), *argT* (envolvido no transporte de arginina), *hisJQMP* (envolvidos no transporte de histidina), *nasFEDCBA* (envolvidos na assimilação de nitrato) e o gene *nifA*, cujo produto regula a transcrição dos genes *nif* (Merrick & Edwards, 1995).

A reação de fosforilação de NtrC é catalisada pela proteína histidina quinase/fosfatase NtrB (Ninfa & Magasanik, 1986). A atividade da proteína NtrB, por sua vez, é regulada pela interação com a proteína GlnB. A proteína GlnB uridililada (baixa disponibilidade de nitrogênio fixado) não liga NtrB que, na forma livre, catalisa a fosforilação de NtrC, ativando-a (Jiang & Ninfa, 1999). A proteína NtrC fosforilada irá ativar a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio. Nesse processo, NtrB se

autofosforila no resíduo His-139, numa reação que envolve hidrólise de ATP (Ninfa & Magasanik, 1986).

A proteína GlnB também participa da regulação da atividade da enzima Glutamina Sintetase (GS). A enzima GS, que catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia, é regulada por modificação pós-traducional (adenilação/desadenilação). A reação de adenilação/desadenilação da GS é catalisada pela enzima ATase (GlnE) (Arcondéguy *et al*, 2001). A enzima ATase, por sua vez, tem sua atividade regulada pela proteína GlnB. Em altos niveís de nitrogênio fixado, a ATase forma um complexo com GlnB não modificada e glutamina, e catalisa a adenililação de GS, inativando-a. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a GS é ativada por desadenilação também catalisada pela ATase complexada a GlnB-UMP_3.

Van Heeswijk e colaboradores (1996) descreveram em *E. coli* uma segunda proteína do tipo PII, a GlnK (codificada pelo gene *glnk*), que possui 67% de identidade com a GlnB do mesmo organismo. Esse gene é co-transcrito com o gene *amtB*, que codifica para a proteína AmtB, um transportador de amônio. Essa organização em operon dos genes *glnK* e *amtB* mostrou-se conservada em muitas outras bactérias (Arcondéguy *et al*, 2001). Em *H. seropedicae* também existem dois genes que codificam para proteínas do tipo PII, *glnB* e *glnK*, sendo que este último forma um operon com os genes *amtB*, o transportador de amônio, e *orf1*, cujo produto tem função ainda desconhecida (Benelli *et al*, 1997; Noindorf *et al*, 2005). A *orf1* foi recentemente denominada *nlmA* (Huergo *et al*, 2010). Ao contrário do que acontece com o gene *glnB*, cuja expressão é constitutiva, a expressão do operon *glnKamtB* está normalmente sob controle de NtrC (Noindorf *et al*, 2005).

Thomas e colaboradores (2000b), baseados na ligação genética existente entre os genes *glnk* e *amtB*, propuseram que GlnK e AmtB poderiam interagir fisicamente para regular a atividade de AmtB *in vivo*. Posteriormente, Coutts e colaboradores (2002) mostraram que a proteína GlnK de *E. coli* e *A. vinelandii* é seqüestrada na membrana, de forma dependente de AmtB e que, na ausência de GlnK, a atividade de AmtB aumenta, indicando que GlnK provavelmente age como um regulador negativo do transportador. Essa ligação na membrana é dependente do estado de uridililação de GlnK e dependente da disponibilidade de nitrogênio na célula, sendo que é máxima quando a

quantidade de nitrogênio fixado é alta (Coutts *et al*, 2002). Javelle e colaboradores (2004) mostraram que se forma um complexo GlnK desuridililada - AmtB cerca de 30 segundos após a adição de amônia em uma cultura crescendo em condições limitantes de nitrogênio, e que este complexo diminui a captação de amônia pelo transportador (Javelle *et al*, 2004). Resultados semelhantes também foram mostrados em *H. seropedicae, Azospirillum brasilense* e *Rhodospirillum rubrum,* onde GlnK (*R. rubrum* e *H. seropedicae*) ou GlnZ (*A. brasilense*) desuridililadas formam um complexo com a membrana, de maneira dependente de AmtB, indicando que proteínas do tipo PII parecem interagir com AmtB (Wang *et al*, 2005; Huergo *et al*, 2006; Huergo *et al*, 2010). Recentemente, a estrutura tridimensional do complexo GlnK-AmtB de *E. coli* foi descrita (Conroy *et al*, 2007; Gruswitz *et al*, 2007).

1.4.1 Ligação de moléculas efetoras às proteínas PII

Além da regulação pós-traducional, as proteínas PII podem ligar metabólitos efetores para modular a interação com seus alvos. Consequentemente, as proteínas PII são capazes de sensoriar e integrar três sinais metabólicos diferentes: nitrogênio, energia e carbono, que são sinalizados respectivamente por glutamina, razão ATP/ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) (Arcondéguy *et al*, 2001). Como já discutido anteriormente, os níveis de glutamina controlam a atividade GlnD, que catalisa a uridililação/desuridililação de PII. Já ATP e 2-OG podem regular a uridililação das proteínas PII ligando-se diretamente a elas, e não a GlnD (Kamberov *et al*, 1995; Jiang *et al*, 1998a). Em *E. coli* a variação dos níveis de 2-OG não é suficiente para influenciar a modificação covalente de PII por GlnD, no entanto a ligação de 2-OG em PII é capaz de modular sua interação direta com proteínas-alvo (Jiang *et al*, 1998a).

Em *E. coli*, a proteína PII apresenta três sítios de ligação para ATP e três sítios de ligação de 2-OG, sendo que nos dois casos a ligação de um efetor exerce cooperatividade negativa na ligação dos próximos (Jiang & Ninfa 2007). O ADP também é capaz de se ligar à proteína PII, competindo pelo mesmo sítio de ligação de ATP, o que permite a essas proteínas monitorar os níveis energéticos da célula (Jiang & Ninfa, 2007).

Em concentrações fisiológicas de 2-OG, pelo menos uma molécula de 2-OG é ligada por trímero (Kamberov *et al*, 1995). Como existe cooperatividade negativa na ligação das próximas moléculas de 2-OG na proteína, a forma completamente saturada de PII com 2-OG só acontece em concentrações bastante altas de 2-OG, quase acima da faixa fisiológica (Kamberov *et al*, 1995). A ligação de 2-OG regula a habilidade de PII de interagir com ATase. A forma completamente saturada de 2-OG não é capaz de interagir NtrB (Kamberov *et al*, 1995). Dessa forma, o sinal de carbono pode ir contra o sinal de nitrogênio, resultando na integração de dois tipos de informação (Ninfa & Atkinson, 2000).

1.5 Ativação da transcrição de promotores σ^{54} dependente

Para que ocorra a transcrição de qualquer gene, o núcleo da RNA polimerase, composto pelas subunidades $\alpha_2\beta\beta'\omega$, precisa se combinar com uma subunidade sigma. Assim, forma-se a holoenzima RNA polimerase, $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$, que é capaz de transcrever o gene. Existem diferentes fatores sigma, que são capazes de distinguir entre diferentes promotores, requeridos para diferentes funções celulares (Buck *et al*, 2000). O fator sigma determina a especificidade da RNA polimerase (Paget & Helmann, 2003). Ele participa do reconhecimento e ligação ao promotor alvo, e na desnaturação do DNA, para que ocorra a transcrição (Fenton *et al*, 2000; Guo & Gralla, 1998; Wosten, 1998).

Baseando-se em critérios estruturais e funcionais, é possível dividir os diferentes tipos de fatores sigma em dois grupos: σ^{54} e σ^{70} (Buck *et al*, 2000). σ^{70} é a maior classe, responsável pela transcrição da maioria dos genes durante o crescimento exponencial de uma bactéria (Lonetto *et al*, 1992). σ^{54} corresponde a uma classe de fatores sigma não homólogos a sigma-70, responsável pela transcrição de genes cujos produtos desempenham diversas funções biológicas, geralmente não essenciais para a sobrevivência da bactéria (Merrick & Chambers, 1992).

A subunidade σ^{54}, codificada pelo gene *rpoN*, foi inicialmente identificada em enterobactérias (Hirschman *et al*, 1985; Hunt & Magasanik, 1985), mas

posteriormente foi descrita em muitas outras bactérias, incluindo gram-negativas e gram-positivas (Buck *et al*, 2000). O mecanismo de iniciação da transcrição dependente de σ^{54} parece ser comum para os diferentes genes estudados até o momento (Kustu *et al*, 1989). A subunidade σ^{54} da RNA polimerase necessita da presença de uma proteína ativadora de transcrição para que ela exerça sua função (Reitzer & Schneider, 2001) (Figura 2). Isto permite que a transcrição a partir de promotores dependentes de σ^{54} possa ser estreitamente regulada, com baixos níveis de escape de transcrição (Wang & Gralla, 1998).

Os ativadores de transcrição dependentes de σ^{54}, também chamados de EBPs ("enhancer binding protein"), ligam-se no DNA em regiões relativamente distantes do início de transcrição, conhecidas como "enhancers" ou UAS ("upstream activator sequence"). Eles interagem com o complexo de transcrição através de uma volta no DNA, que aproxima o UAS do promotor (Scott *et al*, 2000; Buck *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2002). Os ativadores de transcrição possuem seqüências consenso de ligação de ATP, que é hidrolisado para que a transcrição possa ser iniciada. Análise e comparação de seqüências das EBPs permitiram identificá-las como pertencentes à superfamília das proteínas AAA+ ("ATPases associated with various cellular activities") (Schumacher *et al*, 2004). Um esquema do processo de ativação de transcrição σ^{54}-dependente está mostrado na figura 2.

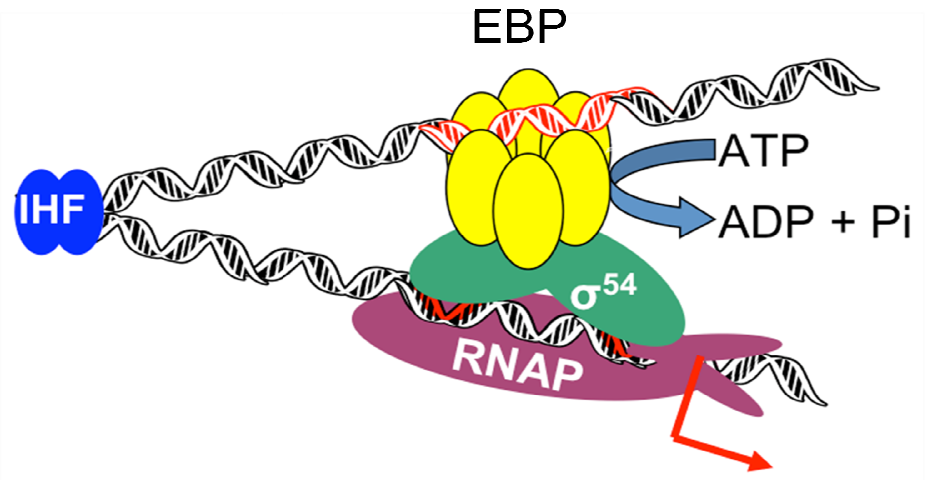


FIGURA 2 – MODELO ESQUEMÁTICO DA ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO σ^{54}-DEPENDENTE. O núcleo da RNA polimerase (RNAP) forma um complexo com o DNA e faz contato com a subunidade σ^{54}. Uma volta no DNA, facilitada por IHF aproxima o ativador de transcrição (EBP) do complexo promotor. O ativador então hidrolisa o ATP em ADP+Pi e a mudança conformacional motivada pela hidrólise é transduzida para o complexo de modo a abrir a dupla-hélice do DNA permitindo o início da transcrição. (Figura gentilmente cedida por Ray Dixon).

As EBPs ligam-se nas UAS através de um motivo conservado hélice-volta-hélice de ligação ao DNA contido no domínio C-terminal (Cannon *et al*, 1990; Bondareko *et al* 2002).

A RNA polimerase σ^{54} reconhece regiões conservadas no promotor do gene, localizadas nas seqüências consenso –12 e –24 (Zhang *et al*, 2002). Antes da ativação da transcrição, a holoenzima RNA polimerase forma um complexo fechado com o promotor do gene a ser transcrito (Sasse-Dwight & Gralla, 1988). Esse complexo fechado é bastante estável e, por isso, não isomeriza espontaneamente para o complexo aberto. Nesse momento uma volta no DNA aproxima a EBP do complexo fechado (Su *et al*, 1990). Essa

volta é favorecida por proteínas indutoras de curva (Carmona & Magasanik, 1996; Carmona *et al*, 1997). A proteína IHF ("integration host factor") é responsável por dobrar o DNA para aproximar EBPs do sítio de ligação da RNA polimerase de vários promotores σ^{54}-dependentes (Carmona & Magasanik, 1996; Carmona *et al*, 1997; Wassem *et al*, 2000; Wassem *et al*, 2002). Após o dobramento do DNA pode ocorrer a isomerização do complexo fechado para um complexo aberto, em um passo que requer a hidrólise de ATP (Buck *et al*, 2000). Dessa forma, os processos de formação do complexo fechado e isomerização para complexo aberto, podem ser regulados de forma independente (Wang & Gralla, 1998).

As EBPs apresentam atividade ATPasica em resposta a um determinado sinal ambiental e, dessa forma, geram energia para formar o complexo aberto e, através disso, ativar a transcrição. Quando o estímulo fisiológico é retirado, a atividade ATPasica é desligada e os promotores voltam ao estado de complexo fechado inativo (Buck *et al*, 2000).

1.5.1 Ativadores de transcrição dependentes de σ^{54}

Entre as proteínas ativadoras de transcrição mais bem estudadas até o momento estão as proteínas PspF, DctD, XylR, NtrC, ZraR e a proteína NifA, que foi o objeto de estudo deste trabalho.

As proteínas da superfamília AAA+ são caracterizadas por um domínio (domínio AAA) de ligação a ATP de 200 a 250 aminoácidos (Hanson & Whiteheart, 2005), que nos ativadores de transcrição corresponde ao domínio modular central. Esse domínio contém os motivos altamente conservados Walker A (GxxxxGK[T/S], onde x representa qualquer aminoácido) e Walker B (hhhhDE, onde h representa aminoácidos hidrofóbicos) (Rappas *et al*, 2006b). O motivo Walker A é responsável pela ligação do nucleotídeo, o Walker B pela hidrólise do mesmo (Rappas *et al*, 2006b). A figura 3 mostra um modelo estrutural do domínio AAA+ da proteína PspF de *E. coli*.

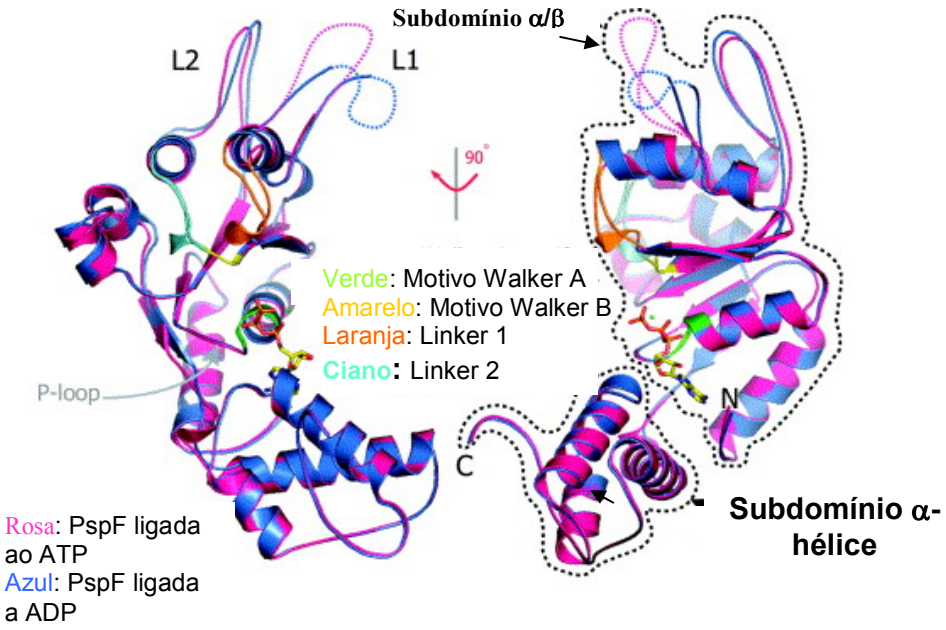


FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DO DOMÍNIO AAA+ DA PROTEÍNA PspF DE *E. coli*. Modelo estrutural da proteína PspF de *E. coli* ligada a ADP (modelo azul) e a ATP (modelo rosa). Os dois modelos estão superpostos e alguns dos motivos funcionais estão destacados. (Rappas *et al*, 2006a).

As EBPs são tipicamente diméricas no estado inativo. As proteínas da família AAA+, na forma biologicamente ativa, normalmente existem como oligômeros, geralmente hexâmeros (Rappas *et al*, 2006b) (Figura 4). No hexâmero, os sítios para ligação de ATP ficam posicionados na interface das subunidades (Lupas & Martin, 2002). Esse fato permite que existam ligações diretas e indiretas entre os sítios de ligação de nucleotídeos de subunidades adjacentes. O hexâmero tem um arranjo em forma de anel, com um poro central, que é margeado por aminoácidos de cada um dos monômeros (Hanson & Whiteheart, 2005).

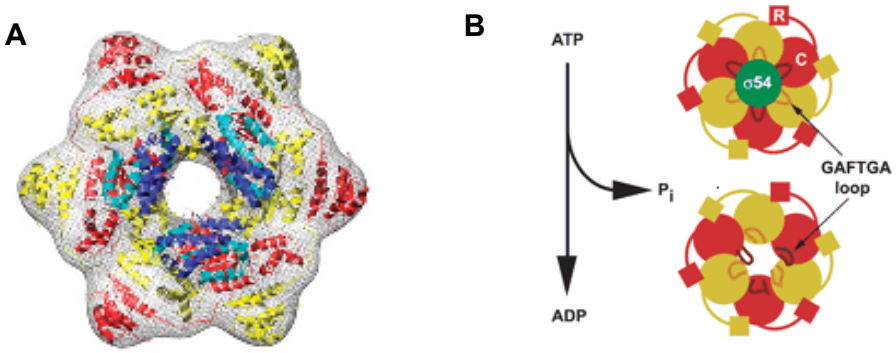


FIGURA 4 – MODELO ESTRUTURAL DE UM HEXÂMERO ATIVO DE NtrC DE *Salmonella typhimurium.* **(A**) Vista superior do modelo tridimensional da proteína NtrC *Salmonella typhimurium*. Os monômeros de NtrC tem seus domínios central e regulatório representados pelas cores vermelhas ou amarelas, de forma alternada. As cores azul claro e azul escuro representam o domínio de ligação ao DNA. (**B**) Mecanismo esquemático do remodelamento do hexâmero de NtrC em resposta à hidrólise de ATP. A estrutura R representa o domínio regulatório da proteína, e a C o domínio central. No momento da hidrólise do ATP, o motivo GAFTGA está exposto, e interagindo com a σ^{54} (círculo verde). Quando o fosfato é liberado, o GAFTGA deixa de interagir com σ^{54} e muda a sua conformação. (De Carlo *et al*, 2006).

Rappas e colaboradores (2005) mostraram que a proteína PspF, uma ativadora de transcrição, faz contato com a subunidade σ^{54} através de duas alças, que foram denominadas de L1 e L2. Na superfície da alça L1, foi identificado o motivo GAFTGA, que é altamente conservado nos ativadores de transcrição (Rappas *et al*, 2005; Buck *et al*, 2006). Esse motivo está contido na hélice 3 do subdomínio α/β. Resultados bioquímicos anteriores já haviam demonstrado a importância desse motivo para a interação entre o ativador e a subunidade σ^{54} (Chaney *et al*, 2001; Bordes *et al*, 2004; Gallegos *et al*, 1999). A energia química liberada pela hidrólise do ATP no sítio ativo promove mudanças conformacionais que culminam com uma mudança de posição das alças L1 e L2. A figura 5 mostra um modelo estrutural do contato entre a proteína PspF de *E. coli* com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase.

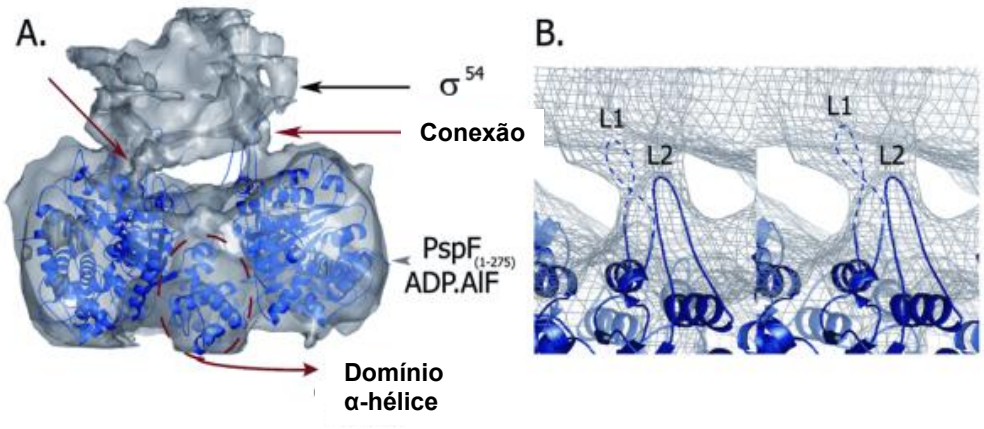


FIGURA 5 – MODELO ESTRUTURAL DO CONTATO ENTRE O HEXÂMERO DE PspF DE *E. coli* E σ^{54} BASEADO EM MAPA DE DENSIDADE ELETRÔNICA. (A) Vista frontal do mapa de densidade eletrônica em cinza e a estrutura cristal da proteína PspF em azul. As densidades de conexão entre as duas proteínas está apontada com flechas vermelhas. (B) Visão detalhada do contato entre as alças L1 e L2 do ativador de transcrição e a subunidade σ^{54}. (Rappas *et al*, 2005).

1.6 Proteína NifA

A proteína ativadora de transcrição dos genes *nif*, que atua em conjunto com a RNA polimerase - σ^{54}, é a NifA. Esse mecanismo de ativação foi encontrado em todas as proteobactérias diazotróficas estudadas até o momento (Dixon & Kahn, 2004). A proteína NifA liga-se no elemento UAS do DNA (5'-TGT-N_{10}-ACA-3'). Esta seqüência está localizada a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (Morett *et al*, 1988; Morett & Buck, 1988). Souza e colaboradores (1991a) identificaram e seqüenciaram o gene *nifA* de *H. seropedicae*.

1.6.1 Estrutura e função dos domínios da proteína NifA

A proteína NifA contém três domínios estruturalmente e funcionalmente distintos (Morett & Segovia, 1993). A figura 6 mostra, de forma esquemática, os três domínios modulares da proteína NifA de *H*. *seropedicae*. O domínio central, típico dos membros da família AAA+, liga ATP e é flanqueado pelo C-terminal que contém um motivo hélice-volta-hélice, e pelo N-terminal, com função regulatória (Dixon & Kahn, 2004). Essa distribuição em domínios modulares é comum entre as EBPs (Drummond *et al*, 1986; Monteiro *et al* 1999a).

O domínio N-terminal é o menos conservado de todos, com um baixo grau de identidade (Fischer, 1994). Esse domínio não é essencial para a atividade da proteína, tendo em vista que proteínas NifA com o domínio N-terminal deletado apresentam atividade (Fischer *et al*, 1988; Monteiro *et al*, 1999a). O exato papel desse domínio ainda não está claro, mas provavelmente é diferente entre os diazotrofos, e parece estar relacionado com regulação da atividade da proteína (Fischer *et al*, 1988; Fischer, 1994). Em *H. seropedicae* esse domínio parece estar envolvido no controle da atividade da proteína NifA por íons amônio, uma vez que pode ser deletado sem interferir na atividade, eliminando, porém a inibição por esse sinal ambiental (Souza *et al*, 1999; Monteiro *et al*, 1999a).

Os domínios N-terminal e central são separados por uma pequena região interdomínios, rica em resíduos de glutamina, e por isso conhecida como Q-linker (LQ) (Wootton & Drummond, 1989).

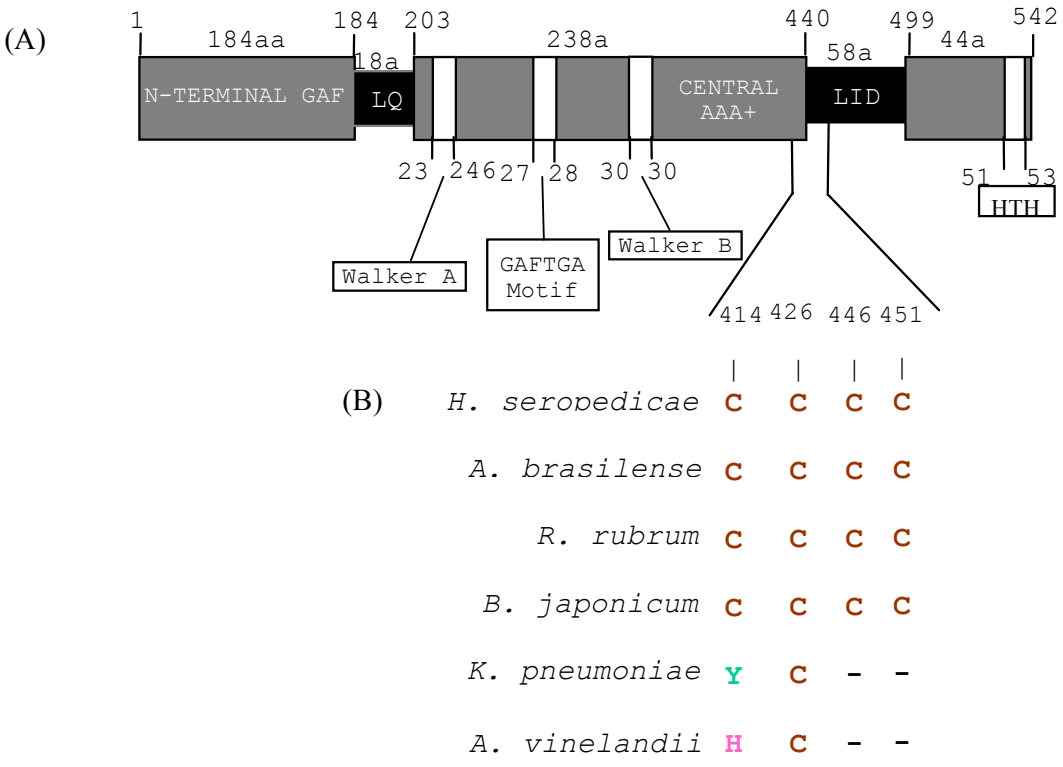


FIGURA 6 – MODELO ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE *H. seropedicae* E ALINHAMENTO DO MOTIVO CONSERVADO DE CISTEÍNAS. (A) Os domínios N-terminal, central e C-terminal são mostrados no modelo. Os motivos Walker A e Walker B, típicos de ATPases,o motivo GAFTGA, assinatura das proteínas pertencentes à superfamília AAA+ e o motivo hélice-volta-hélice (HTH) são também mostrados no esquema. (B) Alinhamento dos aminoácidos do motivo conservado de cisteínas da proteína NifA de *H. seropedicae* com as posições correspondentes das proteínas NifA de α-Proteobactérias (*A. brasilense, R. rubrum* e *B. japonicum*) e γ-Proteobactérias (*K. pneumoniae* e *A. vinelandii*). O motivo de cisteínas não está presente nas γ-Proteobactérias, que possuem proteína NifL.

O domínio central é bastante conservado e possui em torno de 240 aminoácidos (Fischer *et al*, 1988). Ele não é exclusivo da proteína NifA, mas é comum a pelo menos 13 proteínas ativadoras de transcrição, que pertencem à família AAA+ (Morett & Segovia, 1993). Esse domínio interage com a σ^{54} e hidrolisa ATP para que possa ocorrer a formação do complexo aberto, sendo, portanto, o domínio da proteína NifA que apresenta atividade catalítica (Drummond *et al*, 1986; Morett & Segovia, 1993; Berger *et al*, 1995). As proteínas NifA de *Klebsiella pneumoniae* e *Sinorhizobium meliloti* e a DctD de *Rhizobium leguminosarum* apresentam alguma atividade quando o domínio central é separado dos outros domínios, indicando que nesses casos o domínio catalítico é capaz de ativar a transcrição a partir de promotores alvo mesmo sem ligação ao DNA (Morett *et al*, 1988; Huala *et al*, 1992; Huala & Ausubel, 1989).

O domínio C-terminal de todas as proteínas NifA conhecidas até o momento possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA bastante conservado (Morett & Segovia, 1993). Experimentos de proteção por metilação *in vivo* mostraram que a NifA de *K. pneumoniae* de fato se liga em uma região a montante dos genes ativados por essa proteína (Morett & Buck, 1988). Experimentos semelhantes mostraram que proteínas NifA mutantes na região C-terminal tem sua ligação ao DNA afetada (Morett *et al*, 1988). Monteiro e colaboradores (2003b) mostraram que o domínio C-terminal da NifA de *H. seropedicae* é capaz de ligar-se ao promotor do gene *nifB in vitro*. Experimentos *in vivo* também mostraram que o domínio C-terminal da NifA de *H. seropedicae*, quando co-expresso com a proteína NifA N-truncada, diminui a atividade desta, sugerindo que o domínio C-terminal compete com a NifA N-truncada pela ligação no promotor (Monteiro *et al*, 2003b).

Em *K. pneumoniae*, *A. vinelandii* e *Azoarcus sp.,* o domínio C-terminal e o domínio central são ligados diretamente, sem uma região interdomínios, enquanto que em outras bactérias esses domínios são ligados por um segmento contendo 30 a 50 resíduos de aminoácidos (Fischer, 1994) (Figura 6B). Nas bactérias presentes nas classes α e β das proteobactérias, nos quais essa região está presente, o segmento interdomínios é caracterizado por um motivo de quatro cisteínas (Cys-X_{11}-Cys-X_{19}-Cys-X_4-Cys) (Fischer *et al*, 1988) (Figura 6B). A mutação de qualquer uma das cisteínas desse motivo na

proteína NifA de *Bradirhizobium japonicum* levou a uma proteína inativa, mostrando que esse motivo é essencial para a atividade da proteína (Fischer *et al*, 1988). Fischer e colaboradores (1989) também mostraram que o espaçamento entre essas cisteínas parece ser importante para a atividade da proteína NifA. O motivo conservado de cisteínas da proteína NifA de *H. seropedicae* também foi mutagenizado, e a atividade *in vivo* dos mutantes pontuais obtidos foi analisada (Oliveira *et al*, 2009). Os resultados mostraram que a substituição de qualquer uma das cisteínas do motivo conservado por serina gera uma proteína incapaz de ativar a transcrição *in vivo.* Acredita-se que esse motivo ligue íons metálicos e, com isso, seja capaz de sensoriar o nível redox da célula, constituindo-se em um sensor de oxigênio da proteína, mas o exato papel dele ainda não foi elucidado (Fischer *et al*, 1988; Souza *et al*, 1999).

1.6.2 Controle da atividade da proteína NifA

A atividade da proteína NifA das proteobactérias diazotróficas é quase sempre regulada em resposta a dois sinais ambientais: os níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. O mecanismo de regulação na classe γ das proteobactérias é bastante diferente do observado nas classes α e β: na subdivisão γ a proteína NifL inibe a NifA diretamente, em resposta a esses sinais ambientais.

1.6.2.1Controle da atividade da proteína NifA nas γ-proteobactérias

Nas γ-proteobactérias diazotróficas, como *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, o gene *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL*. A proteína NifL funciona como um antiativador, regulando a atividade da proteína NifA em resposta aos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado (Merrick *et al*, 1982; Dixon & Kahn, 2004). Diferente do que ocorre nos sistemas regulatórios de dois componentes, nos quais uma cascata de fosforilação transmite o sinal ambiental, nesse sistema ocorre uma interação proteína-proteína, formando um complexo NifL-NifA em condições desfavoráveis para a fixação de nitrogênio (Austin *et al*, 1994). Na presença de nitrogênio fixado ou oxigênio, NifL é ativa e inibe a atividade ATPásica do

domínio AAA+ da proteína NifA (Martinez-Argudo *et al*, 2004a). Essa inibição parece estar relacionada com o motivo GAF do domínio N-terminal da proteína NifA, indicando que esse domínio controla a atividade do domínio AAA+ em resposta à proteína NifL (Martinez-Argudo *et al*, 2004b).

No domínio N-terminal da proteína NifL são encontrados um ou mais motivos sensoriais PAS (Zhulin *et al*, 1997). O domínio PAS encontra-se distribuído em proteínas de organismos bastante distintos, como bactérias, arquéias, fungos, insetos e vertebrados, e está envolvido na recepção de diversos sinais ambientais como oxigênio, luminosidade, potencial redox e outros estímulos (Taylor & Zhulin, 1999). A especificidade da recepção está normalmente relacionada com cofatores que se associam com o motivo. No caso da proteína NifL, o cofator associado ao motivo PAS é o FAD (Hill *et al*, 1996).

A NifL responde aos níveis de oxigênio, por se tratar de uma proteína sensível ao potencial redox (Dixon & Kahn, 2004). Na ausência da proteína NifL, a proteína NifA não apresenta sensibilidade ao oxigênio (Lee *et al*, 1993). A proteína NifL inibe a proteína NifA diretamente em resposta ao estado redox do cofator FAD ligado em sua região N-terminal. A NifL apenas permite a atividade da proteína NifA na ausência de oxigênio, quando a flavina se encontra no estado reduzido (Hill *et al*, 1996; Schmitz, 1997; Macheroux *et al*, 1998). A forma reduzida da proteína NifL parece favorecer a associação desta com a membrana, resultando no seqüestro da NifL, permitindo que a NifA citoplasmática ative os genes *nif*. Na presença de O_2, a NifL parece ser diretamente oxidada, o que leva a sua dissociação da membrana (Klopprogge *et al*, 2002).

Ainda não está completamente claro como ocorre a transferência de elétrons para o grupamento flavina da proteína NifL. Grabbe e colaboradores (2001) mostraram que a proteína regulatória Fnr, que funciona como um sensor inicial de oxigênio, parece ser necessária para inibição de NifA por NifL em resposta aos níveis de oxigênio. Posteriormente, a atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae* foi testada em estirpes de *E. coli* mutantes em genes que codificam para proteínas integrantes das cadeias respiratórias aeróbicas e anaeróbicas (Grabbe & Schmitz, 2003). Os resultados indicaram que a proteína NifL parece ser reduzida pelo pool de quinonas reduzidas pela cadeia

respiratória anaeróbica (Grabbe & Schmitz, 2003). A hipótese formulada pelos autores é que, em condições de anaerobiose, Fnr ativa a transcrição de oxidoredutases ligadas à membrana, levando a uma razão quinol/quinona que permite a transferência de elétrons para a NifL (Grabbe & Schmitz, 2003). Nessas condições, para que a forma reduzida não exerça um efeito inibitório sobre NifA, a proteína NifL reduzida se associa com a membrana, resultando no seqüestro da NifL, permitindo que a NifA citoplasmática ative os genes *nif*. Na presença de O_2, NifL é oxidada diretamente por O_2 e dissocia da membrana (Grabbe & Schmitz, 2003). Recentemente Milenkov e colaboradores (2010) demonstraram através de mutagênese pontual que os aminoácidos Q57 e N67, localizados na superfície da proteína NifL de *K. pneumoniae*, participam da interação da proteína com a membrana em ambiente redutor, sendo essenciais para o seqüestro de NifL nessas condições.

A proteína NifL de *A. vinelandii* também responde a adenosina-nucleotídeos. Na presença de ATP e ADP, mas não de AMP, a atividade inibitória da NifL desse microrganismo aumenta (Dixon, 1998). Eydmann e colaboradores observaram que a adição de um sistema de geração de ATP previne a inibição de NifL na ausência de oxigênio (Eydmann *et al*, 1995). Por isso, acredita-se que a inibição ocorra devido à formação de ADP pela atividade catalítica da proteína NifA. Então, ADP parece ser um efetor da atividade da proteína NifL (Eydmann *et al*, 1995). A presença de ADP provavelmente potencializa a sensibilidade da proteína NifL aos níveis redox, tendo em vista que até a forma reduzida da proteína, em condições anóxicas, responde à presença de ADP.

Além de inibir a proteína NifA em resposta aos níveis de oxigênio, a proteína NifL também funciona como um anti-ativador em resposta aos níveis de nitrogênio fixado. Mutações no gene *nifL* eliminaram a regulação da ativação da transcrição dos genes *nif* em resposta aos níveis de nitrogênio fixado (Bali et al, 1992), sugerindo que a NifL age como um sensor de nitrogênio (Dixon, 1998). A informação quanto ao *status* de nitrogênio na célula é transferida à proteína NifL pelo sistema Ntr, via proteínas PII (Martinez-Argudo, 2004a). Em mutantes *glnK* de *K. pneumoniae*, a proteína é NifA inativada constitutivamente pela proteína NifL. Esse resultado indica que GlnK parece ser necessária para impedir a inibição de NifA por NifL em condições de

baixas concentrações de nitrogênio fixado (He *et al*, 1998; Jack *et al*, 1999). Stips e colaboradores (2004) mostraram que em condições limitantes de nitrogênio em *K. pneumoniae* forma-se um complexo ternário GlnK-NifL-NifA, com baixas quantidades de GlnK. Além disso, esses autores encontraram evidências de que em anaerobiose, mas na presença de amônia ocorre síntese de GlnK independente de NtrC, o que inibe a formação do complexo NifL-NifA. Esses resultados levaram os autores a propor que o complexo GlnK-NifL-NifA é uma estrutura de transição e, em condições limitantes de nitrogênio, GlnK interage com o complexo NifL-NifA, resultando em sua dissociação (Stips *et al*, 2004).

Outros resultados sugerem que o estado de uridililação de GlnK de *A. vinelandii* parece ser importante para a formação ou não do complexo (Dixon & Kahn, 2004). Mutações em *glnD* de *A. vinelandii*, que geram proteínas com uma atividade de uridililtransferase diminuída, impedem a transcrição dos genes *nif*. O fenótipo dos mutantes pode ser revertido com uma segunda mutação no gene *nifL*, indicando que NifL inibe NifA constitutivamente nos mutantes *glnD* (Colnaghi *et al*, 2001; Contreras *et al*, 1991). Reforçando essa hipótese, Rudnick e colaboradores (2002) mostraram que em *A. vinelandii* a proteína GlnK contendo a mutação Y51F, que não é uridililada por GlnD em nenhuma situação, também leva a uma inibição da proteína NifA por NifL de forma constitutiva. Experimentos *in vitro* mostraram que GlnK não uridililada interage com NifL de *A. vinelandii* para inibir a atividade da proteína NifA, e essa interação não acontece quando GlnK está uridililada (Little *et al*, 2002). A interação de GlnK com NifL de *A. vinelandii* também foi detectada em experimentos *in vivo* (Money *et al*, 1999). O motivo PAS no domínio N-terminal da proteína NifL de *A. vinelandii* parece não ser importante para a sensibilidade aos níveis de nitrogênio fixado e o domínio C-terminal parece ser o responsável por interagir com GlnK e formar o complexo ternário GlnK-NifA-NifL (Little *et al*, 2002). Portanto, parecem existir várias diferenças no mecanismo pelos quais o sistema NifL-NifA de *A. vinelandii* e *K. pneumoniae* respondem ao nitrogênio fixado. Em *K. pneumoniae* a proteína GlnK é importante para garantir que a proteína NifL não interaja com a proteína NifA em condições limitantes de nitrogênio. Em *A. vinelandii*, a forma não uridililada de GlnK é importante para

interagir com a proteína NifL para inibir a proteína NifA em resposta a altos níveis de nitrogênio fixado.

1.6.2.2 Controle da atividade da proteína NifA nas α e β-proteobactérias

Nas α e β-proteobactérias, como *H. seropedicae* (Souza *et al*, 1991a), a proteína NifL está ausente e, portanto, a proteína NifA deve responder aos sinais ambientais (nitrogênio fixado e oxigênio) por mecanismos diferentes.

A transdução dos sinais de nitrogênio fixado para a proteína NifA dos diazotrofos que não possuem a proteína NifL também ocorre via sistema Ntr (Dixon & Kahn, 2004). Em *H. seropedicae*, *A. brasilense* e *R. rubrum,* proteínas PII são necessárias para que a proteína NifA tenha atividade (Souza *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2004; Arsene *et al*, 1996; Noindorf, 2006). Araújo e colaboradores (2004) mostraram que GlnZ (proteína PII) de *A. brasilense* não substitui GlnB na ativação de NifA em resposta aos níveis de nitrogênio. Estirpes de *A. brasilense glnD* $^{-}$ e *glnB*$^{-}$ que codifica para uma proteína mutante no aminoácido Tyr 51, que é o sítio para uridililação de GlnB por GlnD, apresentam fenótipo Nif $^{-}$ (Arsene *et al*, 1999). Esse resultado sugere que GlnB uridililada é responsável por liberar a proteína NifA da repressão exercida pelos níveis de nitrogênio fixado (Arsene *et al*, 1999; Van Dommelen *et al*, 2002). Em *R. capsulatus* e *A. caulinodans* a proteína GlnB parece ter um papel diferente, tendo em vista que na sua ausência a proteína NifA é expressa de forma constitutiva, perdendo a regulação por nitrogênio (Michel-Reydellet & Kaminski, 1999; Drepper *et al*, 2003). Pawlowski e colaboradores (2003) mostraram em ensaios de duplo-híbrido que GlnB e GlnK interagem diretamente com a proteína NifA de *R. capsulatus*.

Souza e colaboradores (1999) mostraram que o domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* parece ser o responsável pela recepção do sinal da presença de nitrogênio. Em *A. brasilense*, a proteína NifA truncada na região N-terminal perde a regulação por nitrogênio, sendo ativa tanto na presença de amônia, quanto na ausência de GlnB (Arsene *et al*, 1996). Esse resultado sugere que GlnB pode ser necessária para ativar a proteína NifA antagonizando o efeito inibitório do N-terminal sobre os outros dois domínios. Paschen e colaboradores (2001) construíram proteínas NifA de *R. capsulatus*

mutantes e analisaram suas atividades em resposta à concentração de nitrogênio fixado. Esse trabalho mostrou que a mutação L66Q gerou uma proteína NifA tolerante à amônia. Uma combinação dessa mutação com a K531T, no domínio C-terminal, resultou em um fenótipo semelhante, enquanto que a proteína NifA contendo apenas a mutação K531T não apresentou atividade em nenhuma condição (Paschen *et al*, 2001). Portanto, a mutação no resíduo Leucina 66 é capaz tanto de conferir tolerância a amônia a proteína NifA, quanto de suprimir o fenótipo negativo da mutação no aminoácido lisina 531. Este trabalho também mostrou que mutações na região interdomínio (I460F e E477Q) geraram proteínas NifA insensíveis à presença de amônia (Paschen *et al*, 2001). Esses resultados sugerem fortemente que os aminoácidos mutados podem participar de interações intra ou intermoleculares do domínio N-terminal com os outros domínios, modulando a atividade desses em resposta à presença de amônia. Experimentos posteriores sugerem que o resíduo Tirosina 18 do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* parece ser essencial para regulação da atividade da proteína NifA via GlnB (Arsene *et al*, 1999). Chen e colaboradores construíram proteínas NifA de *A. brasilense* mutantes nos aminoácidos Tirosina 18 e ou Tirosina 53, ambos substituídos por Fenilananina (Chen *et al*, 2005). As proteínas com mutação em apenas um dos dois aminoácidos ainda interagiam com GlnB (Chen *et al*, 2005). No entanto, a proteína NifA duplo mutante apresentou uma atividade alta, e testes de duplo híbrido não foram capazes de detectar interação entre essa proteína e a GlnB (Chen *et al*, 2005). Esses resultados indicam que a proteína GlnB pode interagir diretamente com a proteína NifA, e os aminoácidos Tyr 18 e Tyr 53 estariam envolvidos no contato entre a proteína NifA e a proteína GlnB.

Reforçando a hipótese de que o domínio N-terminal GAF interage com os domínios AAA+ e C-terminal para regular sua atividade, Monteiro e colaboradores (1999b e 2001) mostraram que a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* tem sua atividade catalítica inibida pelo domínio N-terminal expresso separadamente, indicando que a regulação do N-terminal sobre os outros domínios pode ocorrer em *trans*.

Nos diazotrofos em que a proteína NifL está ausente, a proteína NifA possui um motivo com quatro cisteínas conservadas, localizadas no domínio central e

na região interdomínios existente entre os domínios central e C-terminal (Fischer, 1994). Como esse motivo se encontra conservado apenas nos organismos que não possuem proteína NifL e é importante para a manutenção da atividade da proteína NifA, acredita-se que ele possa ser o sítio de sensibilidade ao oxigênio da proteína NifA (Fischer *et al*, 1988; Fischer *et al*, 1989). Fischer e colaboradores (1988) demonstraram que íons ferro são importantes para a atividade da proteína NifA de *B. japonicum*. Resultado semelhante também foi encontrado por Souza e colaboradores (1999) para a NifA de *H. seropedicae*. Esses resultados sugerem que o motivo conservado de cisteínas seja um sítio para a ligação de íons ferro, e a atividade da proteína NifA poderia ser modulada pelo estado de oxidação desses íons. De fato, o motivo conservado de cisteínas encontrado na proteína NifA dos diazotrofos das classes α e β das proteobactérias tem similaridade com outros motivos de potencial ligação de metais de outras proteínas regulatórias (Fischer, 1994). A hipótese formulada é que em baixas concentrações de oxigênio o ferro reduzido possa ser coordenado com a proteína NifA através do motivo de cisteínas, possibilitando o posicionamento correto dos motivos central e C-terminal. Na presença de oxigênio, o ferro na forma oxidada não poderia coordenar com o motivo de cisteínas, resultando numa proteína NifA inativa (Fischer *et al*, 1988). Em uma segunda hipótese, o ferro pode não ter um efeito direto na proteína NifA. Monteiro e colaboradores (2003a) demonstraram que a proteína NifA de *H. seropedicae* não tem atividade em estirpes de *E. coli* mutantes no gene *fnr*, que codifica para a proteína ativadora de transcrição Fnr, que funciona como uma sensora primária de oxigênio, e contém ferro. Portanto, a diminuição da atividade da NifA em resposta a privação de ferro observada por Souza e colaboradores (1999) pode ser causada pela diminuição da atividade da proteína Fnr.

Recentemente, vários estudos bioquímicos e estruturais forneceram muitos dados sobre o mecanismo de ativação σ^{54} dependente, sendo possível caracterizar uma série de passos discretos catalisados pelo ativador (Wigneshweraraj *et al*, 2008). O papel do motivo conservado de cisteínas e a consequente regulação da atividade da proteína NifA por oxigênio na ativação de transcrição pode estar relacionada com qualquer um desses passos. Krey e colaboradores (1991) sugeriram que mudanças conformacionais no motivo

conservado de cisteínas da proteína NifA de *Sinorhizobium meliloti* são transduzidas para o domínio AAA+, causando mudanças na interação com o nucleotídeo, inibindo a ligação ou a hidrólise do ATP. É igualmente possível que o oxigênio influencie outros passos na ativação de transcrição, como a ligação ao DNA até o acoplamento da hidrólise com o remodelamento do complexo fechado.

2. Justificativa

O mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA é bastante distinto entre as bactérias que possuem o anti-ativador NifL e as que não a possuem. Na literatura, existem mais dados relacionados com a regulação de NifA dependente de NifL. Dessa forma, vários aspectos desse mecanismo de regulação já foram descritos em detalhes. No entanto, muito ainda precisa ser elucidado sobre a regulação de NifA em bactérias que não possuem um anti-ativador. No que se refere à regulação da proteína NifA por oxigênio, ainda é necessário demonstrar a exata função do motivo conservado de cisteínas e como ele seria capaz de sensoriar os níveis intracelulares de oxigênio. Com relação à regulação da atividade de NifA pelos níveis de nitrogênio fixado, sabe-se que o domínio N-terminal GAF tem uma atividade inibitória sobre a atividade enzimática de NifA. No entanto ainda não está claro qual é o mecanismo de inibição bem como a via de transdução do sinal de nitrogênio para esse domínio. Portanto, existem muitas perguntas sobre a regulação da atividade da proteína NifA de bactérias que não possuem NifL, como *H. seropedicae*, que ainda precisam ser respondidas. Várias hipóteses já foram montadas, mas que carecem de confirmação. Esse trabalho procura estudar aspectos relacionados com a regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* para tentar responder tais perguntas.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

- Determinar o papel do motivo conservado de cisteínas na atividade da proteína NifA de *H. seropedicae*;
- Determinar o mecanismo de inibição da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* pelo seu domínio N-terminal GAF.

3.2 Objetivos específicos

- Purificar a série de proteínas contendo mutações pontuais nas cisteínas do motivo conservado da proteína NifA de *H. seropedicae*;
- Determinar a capacidade das proteínas mutantes purificadas de ligar ao promotor *nifB* de *H. seropedicae in vitro*;
- Desenvolver um protocolo de purificação da proteína NifA de *H. seropedicae* em atmosfera livre de oxigênio;
- Determinar o conteúdo de ferro na proteína NifA purificada em atmosfera livre de oxigênio;
- Verificar a interação *in vitro* entre o domínio GAF da proteína NifA e a proteína GlnK de *H. seropedicae*;
- Determinar parâmetros termodinâmicos da interação de moléculas efetoras com a proteína GlnK de *H. seropedicae*.

4. Materiais e métodos

4.1 Bactérias e plasmídeos

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Estirpe ou plasmídeo	Fenótipo e/ou genótipo	Referência
Estirpes de *E. coli*		
BL21 (DE3) pLysS	*hsdS gal (λcIts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)* (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs)	Sambrook *et al*, 1989.
Top10	F' mcrA Δ(*mvr – hrd RMS – mcrBC*) ϕ 80 *lacZ* ΔML5 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara – leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Sm^R) *end*A1 *nup*G	Invitrogen
ET8000	*rbs lacZ*::IS*1 gyrA hutC*^c_k (selvagem)	McNeil *et al*, 1982
RB9065(λDE3)	*glnB2306glnD99*::Tn10, Tc^R (promotor T7 polimerase)	Benelli *et al*, 2001
Plasmídeos		
pET28a	Vetor de expressão. Expressa a proteína de fusão com His-Tag/ promotor T7. Km^R	Novagen

pET29a	Km^R, vetor de expressão (sem cauda His), pT7	Novagen
pT7-7	Vetor de expressão/ promotor T7. Amp^R	Tabor e Richardson, 1985.
pRAM2	Contém a seqüência codificadora $NifA_{(202-542)}$, que tem o domínio N-terminal GAF deletado, de *H. seropedicae* clonada no vetor pET-28a/Km^R	Monteiro *et al*, 1999a
pRAM3	Contém a seqüência codificadora domínio GAF da proteína NifA de *H. seropedicae* clonada no vetor pET-28a/Km^R	Monteiro *et al*, 1999b
pMAO1	Contém a seqüência codificadora $NifA_{(202-542)}$ de *H. seropedicae* com a mutação C414S clonada no vetor pET-28a/Km^R	Oliveira *et al*, 2009
pMAO2	Contém a seqüência codificadora $NifA_{(202-542)}$ de *H. seropedicae* com a mutação C426S clonada no vetor pET-28a/Km^R	Oliveira *et al*, 2009
pMAO3	Contém a seqüência codificadora $NifA_{(202-542)}$de *H. seropedicae* com a mutação C446S clonada no vetor pET-28a/Km^R	Oliveira *et al*, 2009

pMAO4	Contém a seqüência codificadora $NifA_{(202-542)}$de *H. seropedicae* com a mutação C451S clonada no vetor pET-28a/Km^R	Oliveira *et al*, 2009
pRT22	*nifH* (*K. pneumoniae*)*::lacZ*/Cm^R	Tuli & Merrick, 1988
pEMB200	*glnK* de *H. seropedicae* em pET-29a+, Km^R	Bonatto *et al*, 2007
pRAM 14	Contém a seqüência codificadora da proteína Quimérica NifAQ2, contendo o domínio GAF de da proteína NifA de *A. vinelandii* e os domínios Central+C-terminal da NifA de *H. seropedicae* expresso a partir do plasmídeo pT7-7.	Oliveira *et al*, 2009
pRAM18	Contém a seqüência codificadora da proteína Quimérica NifAQ1, contendo o domínio GAF de da proteína NifA de *H. seropedicae* e os domínios Central+C-terminal da NifA de *A. vinelandii* expresso a partir do plasmídeo pT7-7.	Oliveira *et al*, 2009

4.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura que foram utilizados para o cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram o Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al*, 1989), Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook *et al*, 1989), Nitrogen-Free Davis e Mignoli (NFDM) (Cannon *et al*, 1974), SOC e SOB (Sambrook *et al*, 1989).

Composição do meio LB:

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

Para a obtenção do meio LA, usado para cultivo em meio sólido, adicionou-se 15 g/L de ágar ao meio LB.

Composição do meio SOB:

	gramas/litro
Triptona	20
NaCl	0,6
KCl	0,186

O meio SOC foi obtido adicionando-se glucose 3,6 g/L, $MgCl_2$ 0,94 g/L e $MgSO_4$ 1,2 g/L ao meio SOB.

Composição do meio NFDM:

	gramas/litro
$MgSO_4$	0,1
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,025
$FeSO_4.7H_2O$	0,025

No momento do uso, foram adicionados no meio 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K_2HPO_4 e 3,4 g/L de KH_2PO_4.

4.3 Antibióticos

Os antibióticos foram adicionados ao meio, de acordo com a resistência da estirpe ou do vetor. Os antibióticos utilizados foram:

	Concentração (μg/mL)
Canamicina	50
estreptomicina	80
ácido nalidíxico	5
ampicilina	250
tetraciclina	10
cloranfenicol	30

As soluções de antibióticos foram preparadas segundo Sambrook e colaboradores (1989), e mantidas a 4°C.

4.4 Transformação bacteriana

4.4.1 Transformação bacteriana por eletroporação

Para o preparo de células eletrocompetentes, um pré-inóculo de 3 mL da célula foi crescido sob agitação durante a noite em meio LB com os antibióticos adequados. O inóculo foi feito a partir de 400 μL de pré-inóculo em 40 mL de meio SOB, em frasco erlenmeyer de 250 mL e crescido até atingir DO_{600} entre 0,6 e 0,8. A cultura foi mantida por 30 minutos no gelo e centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em água bidestilada gelada estéril e uma vez em glicerol 15% gelado. Toda a manipulação foi feita no gelo. As células eletrocompetentes foram mantidas a –70°C em alíquotas de 40 μL.

Para a eletroporação, 1 a 2 μL de DNA plasmidial (aproximadamente 20 ng) foi adicionado a 40 μL de células eletrocompetente e a mistura transferida cuidadosamente para as cubetas de eletroporação. As células foram submetidas a um rápido pulso elétrico de 10 Kv/cm (4 KΩ, 330 μF), e em seguida foram ressuspensas em meio SOC sob agitação a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo os antibióticos apropriados.

4.4.2 Transformação bacteriana por choque térmico

Para o preparo de células termocompetentes, um pré-inóculo de 3 mL da célula foi crescido sob agitação durante a noite em meio LB com os antibióticos adequados. O inóculo foi feito a partir de 400 μL de pré-inóculo em 40 mL de meio SOB, em frasco erlenmeyer de 250 mL e crescido até atingir DO_{600} entre 0,4 e 0,6. A cultura de células foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O “pellet” de células foi então ressuspenso em

aproximadamente 12 mL de solução de $MgCl_2$ 100 mM gelada estéril, levando de 3 a 5 minutos para esse procedimento. As células foram novamente coletadas por centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm e então o sobrenadante descartado. O "pellet" foi ressuspenso em aproximadamente 5 mL de solução de $CaCl_2$ 100 mM gelada estéril. Após a ressuspensão mais 25 mL de solução de $CaCl_2$ foi adicionada. Essa suspensão foi mantida em gelo por pelo menos 20 minutos e então novamente centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 1 mL de solução de $CaCl_2$ 100 mmol/L em 15% de glicerol gelado estéril. As células foram divididas em alíquotas de 100µL e estocadas a -80°C.

Para a transformação as células foram misturadas com 5 µL de DNA plasmidial (aproximadamente 100 ng) e a mistura mantida em gelo por 30 minutos. Após esse tempo, a mistura foi submetida a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e então por 2 minutos em gelo novamente. Em seguida foram ressuspensas em meio SOC e incubadas sob agitação a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo os antibióticos apropriados.

4.5 Purificação do DNA plasmidial

O isolamento e purificação do DNA plasmidial foi feito seguindo o método de lise alcalina descrito por Sambrook e colaboradores (1989) utilizando 1,5 mL de uma cultura de células crescidas durante a noite. As células foram centrifugadas durante 1 minuto a 13000 rpm, o meio sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspendido em 200 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl pH 8,0 25 mmol/L). A lise foi realizada adicionando-se 200 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e 1% de SDS. Essa mistura foi homogeneizada por inversão. O DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados por adição de 200 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L. Essa mistura foi homogeneizada por inversão e mantida por 10 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm, e o

sobrenadante contendo o plasmídeo foi separado em outro tubo, descartando-se o precipitado. A essa solução foi adicionado 200 μL da mistura fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico (25:24:1). A mistura resultante foi agitada para extração e centrifugada por 15 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi coletada e misturada a 0,6 volumes de isopropanol, com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em estufa 37ºC e dissolvido em 30 μL de água MiliQ® autoclavada.

4.6 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose ou ágar 1% (m/v), segundo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados com tampão TBE (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0) e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão. A corrida foi realizada entre 40 a 60 V (aproximadamente 5V/cm de gel), durante um tempo que variava conforme a separação desejada das bandas. O DNA foi visualizado, após tratamento do gel com brometo de etídeo (0,5 μg/mL), em transiluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de fotodocumentação (UVP).

4.7 Ativação da transcrição *in vivo*

Os plasmídeos contendo o gene que codifica para as proteínas NifA mutantes a serem testadas foram transformados em *E. coli* sem atividade de β-galactosidase, de acordo com o item 4.4. Além desses plasmídeos, também foi transformado o plasmídeo pRT22, que contém a fusão *nifH (K. pneumoniae)::lacZ*. Pré-inóculos foram crescidos em meio mínimo NFDM contendo 5% de fosfato, NH_4Cl 20 mmol/L, meio LB 5% e os antibióticos adequados durante a noite a 37°C. Quatrocentos μL do pré-inóculo foram inoculados em 4 mL de meio mínimo NFDM contendo fosfato 5%, NH_4Cl 20

mmol/L e IPTG para concentração final de 0,5 mmol/L. A $D.O._{600}$ da cultura logo após o inóculo era em torno de 0,2. Nos experimentos realizados em anaerobiose o ar contido na fase gasosa das culturas foi trocado pelo gás Argônio. Os inóculos foram agitados em "shaker" por 8h a 30°C. A atividade de β-galactosidase das culturas foi determinada utilizando-se alíquotas de 100 μL da cultura.

4.7.1 Atividade de β-galactosidase

A análise de β-galactosidase foi feita segundo Miller (1992). O meio de reação continha 900 μL de tampão Z (Na_2HPO_4 60mmol/L, NaH_2PO_4 40 mmol/L, KCl 10mmol/L, $MgSO_4$ 1mmol/L, β-mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,1%), 25 μL de clorofórmio e 100 μL da cultura induzida de bactérias. Após mistura, o meio de reação foi incubado a 30°C por 10 minutos. Após esse período, a reação foi iniciada pela adição 200 μL de solução de o-nitrofenil β-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/L e após 30 minutos de incubação a 30°C a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de Na_2CO_3 1 mol/L. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorbância a 420 nm (o-nitrofenol) e 550 nm (turbidez da mistura) da reação e 600 nm (densidade celular) da cultura.

Os cálculos de atividade foram feitos segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade de } \beta\text{-Gal} = \frac{1000\,(DO_{420} - 1{,}75 \times DO_{550})}{t \times V \times DO_{600}}$$

Onde:

t = tempo de incubação (minutos)
V = volume de células utilizadas (mL)
D.O. = Absorbância no comprimento de onda indicado.

A atividade de β-Gal foi expressa em unidades Miller.

4.8 Quantificação de proteínas

A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Esse método colorimétrico é baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com proteínas. O sistema de reação continha 1mL da solução do corante (solução Bradford – 10 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-205, 95% etanol e 85% ácido fosfórico para 1 L de solução) e 100 μL da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm determinada. A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovino como padrão, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. O limite de sensibilidade do método é de 1 a 10 μg de proteína. Alternativamente a concentração de proteínas foi determinada por fluorescência, utilizando kit Quant-it Protein Assay Kit e fluorímetro Qubit, ambos da Invitrogen (Carlsberg, CA, EUA).

4.9 Eletroforese de Proteínas

4.9.1 Eletroforese de Proteínas em gel desnaturante Tris-Glicina-SDS

As eletroforeses de proteína em gel desnaturante Tris-Glicina foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% (m/v) e do gel de empilhamento foi de 4%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo orientação do fabricante (Hoefer). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação. A voltagem da corrida variou de 100 a 200 V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

4.9.2 Eletroforese de Proteínas em gel desnaturante Tris-Tricina-SDS

As eletroforeses de proteína em gel desnaturante Tris-Tricina foram realizadas conforme protocolo descrito Schagger & von Jagow (1987). Esse método permite separar proteínas entre 1 e 100 KDa com maior resolução. O gel separador continha acrilamida 15% (relação acrilamida:bis-acrilamida 29:1), Tris-HCl 1 mol/L pH 8,45, SDS 0,1%, glicerol 15%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha acrilamida 4%, Tris-HCl 750 mmol/L pH 8,45, SDS 0,075%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. Os géis foram submetidos a corridas de 2 horas a 100 V nos tampões cátodo (Tris 100 mmol/L, tricina 100 mmol/L, SDS 0,1%, pH 8,25) e ânodo (Tris 200 mmol/L pH 8,9).

4.9.3 Eletroforese de Proteínas em condições não desnaturantes

As eletroforeses de proteína em gel não desnaturante foram realizadas conforme protocolo descrito Forchhamer & Tandeau de Marsac (1994). O gel separador continha acrilamida 9% (relação acrilamida:bis-acrilamida 29:1), Tris-HCl 450 mmol/L pH 8,9, Nonidet P-40 0,025%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha acrilamida 2,5% (solução estoque 10% de acrilamida e 2,5% de bis-acrilamida), Tris-H_3PO_4 62,5 mmol/L pH 6,9, Nonidet P-40 0,031%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%.

O tampão de amostra não desnaturante foi preparado 5 vezes concentrado (Tris-HCl 250mmol/L pH 6,8, EDTA 20 mmol/L, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,02%). As corridas foram realizadas a 100 V por 3 a 4 horas em tampão de corrida para proteína nativa (Tris 5 mmol/L e glicina 38,4 mmol/L). Este tampão foi preparado 50 vezes concentrado, mantido à temperatura ambiente e diluído no momento do uso.

4.10 Expressão e purificação das proteínas GlnK, domínio GAF e variantes mutantes da proteína $NifA_{(202-542)}$

Os plasmídeos que contém os genes codificadores das proteínas a serem purificadas sob controle do promotor T7 foram transformados em BL21(DE3) (GAF e $NifA_{(202-542)}$) ou RB9065λ(DE3) (GlnK). Vinte mililitros de culturas frescas saturadas das células transformantes foram inoculados em 2 L de LB. As células foram mantidas sob agitação a 37°C até DO_{600} em torno de 0,5, quando então a expressão da proteína foi induzida.

Para as proteínas purificadas na presença de oxigênio, a indução da expressão das proteínas foi feita com 0,5 mmol/L de IPTG por 16 horas a 16°C sob agitação constante. Após indução as células foram coletadas por centrifugação e o "pellet" estocado a -20°C até o momento do uso.

Para a purificação da proteína $NifA_{(202-542)}$ em atmosfera livre de oxigênio, após as células atingirem a DO_{600} de aproximadamente 0,5, as culturas foram resfriadas em gelo por 15 minutos. Após esse tempo adicionou-se às culturas 0,5mmol/L de IPTG e o meio ainda foi suplementado com 200 µmol/L de Citrato de ferro amoniacal, 50 µmol/L de L-Metionina, 2% de glucose, 12 g/L de K_2HPO_4 e 3 g/L de KH_2PO_4. A indução foi feita a 30°C durante três horas. Durante todo o tempo de indução, gás nitrogênio foi borbulhado na cultura por meio de uma pipeta de vidro de 5 mL conectada a um cilindro do gás para garantir a ausência de oxigênio na cultura. Após a indução as células foram coletadas por centrifugação e o "pellet" de células foi mantido a -80°C até o momento da purificação.

4.10.1 Purificação da proteína $NifA_{(202-542)}$ e suas variantes mutantes e do domínio GAF da proteína NifA

O "pellet" de células foi ressuspenso em 30mL de tampão TCN1 (50 mmol/L Tris-Cl pH 8,0. 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L KSCN, 10% glicerol e 20 mmol/L imidazol). As células foram então lisadas por sonicação ou prensa francesa. O extrato de proteínas foi centrifugado a 15000g por 30 minutos a 4°C para separar proteínas solúveis dos debris celulares e das proteínas insolúveis. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna Hi-Trap-Chelating (GE Healthcare)

carregada com níquel previamente equilibrada com tampão TCN1. A proteína foi eluída em concentração crescente de imidazol (20 – 1000 mmol/L). A proteína purificada foi dialisada contra um tampão TCN2 (50 mmol/L Tris-Cl pH8.0, 100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L KSCN, 50% glicerol). As soluções resultantes de proteína foram alíquotadas em 50 µL e estocadas em nitrogênio líquido.

4.10.2 Purificação da proteína GlnK de *H. seropedicae*

O pellet de células foi ressuspenso em 30mL do tampão PP1 (50 mmol/L Tris-Cl pH 8,0; 50 mmol/L NaCl; 5% glicerol). As células foram lisadas por sonicação ou por prensa francesa e o extrato total de proteínas foi aquecido em banho-maria a 80°C por 5 minutos. Esse extrato foi então centrifugado a 15000 rpm a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi aplicado em uma coluna de Hi-Trap-Heparin (GE) pré-equilibrada em tampão PP1. As proteínas foram eluídas em gradiente crescente de NaCl (50-1000 mmol/L). As proteínas purificadas foram dialisadas contra tampão PP2 (50 mmol/L Tris-Cl pH 8,0; 50 mmol/L NaCl; 50% glicerol) e estocada a -80°C.

4.10.3 Purificação da Proteína $NifA_{(202-542)}$ em anaerobiose

A maior parte dos passos para purificação da proteína $NifA_{(202-542)}$ foram realizados no interior de uma *glove box* contendo uma atmosfera de nitrogênio e com a concentração máxima de oxigênio de 8ppm, sendo sempre monitorada por meio de um oxímetro.

Todos os tampões e soluções utilizados na purificação foram borbulhados com nitrogênio e deixados em frascos abertos no interior da *glove box* por pelo menos 24 horas. O mesmo foi feito com todos os tubos, seringas e frascos utilizados na purificação.

No dia da purificação, o “pellet” de células foi colocado no interior da *glove box* e ressuspenso em cerca de 30mL de tampão PP1 (50 mmol/L Tris-Cl pH 8,0; 50 mmol/L NaCl; 5% glicerol). A suspensão de células foi então colocada no interior de uma seringa de 50 mL, que teve sua ponta selada. A seringa

selada foi então retirada da *glove box* para a lise das células em prensa francesa. A amostra foi colocada no interior da câmara da prensa francesa lentamente com um fluxo paralelo constante de nitrogênio. Após a prensa, a solução lisada foi coletada imediatamente dentro da mesma seringa utilizada inicialmente. A seringa foi imediatamente selada após a lise concluída e colocada novamente no interior da *glove box*. A solução de proteínas foi então colocada no interior de tubos de centrífuga seladas com *o-ring* e centrifugadas 15000rpm (Rotor Sorvall T-1270) por 30 minutos a 4°C para separar as proteínas solúveis das insolúvies e debris celulares.

A purificação da proteína dentro da *glove box* foi realizada com o uso de uma bomba peristáltica. As proteínas solúveis foram injetadas em coluna Hi-Trap Heparina de 5 mL e eluídas em gradiente de NaCl até 50 mmol/L a 1000mmol/L. As proteínas coletadas da coluna de Heparina foram diluídas para ficarem novamente em baixa concentração de sal e injetadas em coluna Hi-Trap Q-Sepharose e eluídas em gradiente de NaCl até 50 mmol/L a 1000mmol/L.. As proteínas eluídas foram analisadas em gel de eletroforese desnaturante Tris-Glicina 12%.

4.11 Uridililação *in vitro* da proteína GlnK de *H. seropedicae*

O sistema de uridililação continha ATP (200 µmol/L), 2-OG (5 µmol/L), UTP (10 µmol/L), GlnK (30 µmol/L) e GlnD de *H. seropedicae* (1 µmol/L) em tampão de uridililação (100mmol/L Tris-Cl pH7,5; 100 mmol/L KCl e 25 mmol/L $MgCl_2$). As reações foram iniciadas adicionando UTP (1 mmol/L) e interrompidas com 20 mmol/L de EDTA. O estado de uridililação da proteína após a reação foi determinado através de eletroforese não desnaturante de acordo com o item 4.9.3.

Após a reação, a proteína uridililada foi purificada através de cromatografia de gel-filtração em coluna Superdex 75 (GE Healthcare).

4.12 Marcação radioisotópica da região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* com [^{32}P]

O promotor do gene *nifB* foi marcado de acordo com o método descrito por Monteiro (2001). Nesse método, foi realizada uma reação de PCR com os *primers* p11 e p12 (Souza et al, 1991b), que amplificam a região promotora do gene *nifB*, sendo que um dos *primers* é marcado com gama-fosfato proveniente do [^{32}P] γATP através da enzima T4 Polinucleotídeo Quinase.

4.13 Ligação das variantes de NifA aos seus sítios de ligação na região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*

Os ensaios de ligação foram feitos de acordo com o descrito por Monteiro (2001), utilizando o promotor *nifB* marcado com [^{32}P] de acordo com o ítem 4.12. As reações continham 5pmol do promotor *nifB* marcado com[^{32}P], tampão de ligação (10 mmol/L Tris-Acetato pH8,0, 8 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol CH_3COOK, 1 mmol/L DTT e 3,5% PEG8000), concentrações variadas de proteína e 1 µg de DNA de timo em um volume final de 15 µL. A reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 5 µL de tampão de amostra não desnaturante à amostra (glicerol 50% e azul de bromofenol 0,02%). A reação de ligação foi avaliada através de ensaio de retardamento da banda de DNA em gel de poliacrilamida 5%, em tampão tris-glicina contendo 8 mmol/L de $MgCl_2$. A eletroforese foi corrida a 60 V por 2 horas a 4°C. Os géis foram secos e visualizados com o auxílio do sistema Storm™ 820 Phosphorimager (GE Healthcare). A constante de dissociação (Kd) das proteínas foi determinada através da análise densitométrica da banda de DNA livre feita no *software Labworks* (UVP). O Kd foi calculado como sendo igual a concentração de proteína necessária para ligar 50% do DNA.

4.14 Análise da interação entre o domínio GAF da proteína NifA de *H. seropedicae* e a proteína GlnK através de ensaios de proteólise limitada

O ensaio de proteólise limitada foi realizado em tampão TAP modificado (50 mmol/L Tris-Cl pH8,0, 200 mmol/L NaCl, 8 mmol/L $MgCl_2$ e 1 mmol/L DTT) a 20°C. As reações continham 15 µmol/L de cada proteína, em um volume final de 100 µL e 50 ng de tripsina. Nos tempos 0, 10, 30 e 60 minutos, amostras de 15 µL foram retiradas da reação, e misturadas com 15 µL de tampão de amostra e imediatamente aquecida a 90°C por 10 minutos. As amostras foram então aplicadas em gel de eletroforese desnaturante Tris-Tricina de acordo com o descrito no ítem 4.9.2. Os géis foram então corados com SYPRO Ruby (Invitrogen) e a análise densitométrica das bandas foi realizada com o auxílio do *software* "Labworks" (UVP).

4.15 Determinação das constantes de dissociação da proteína GlnK de *H. seropedicae* e os efetores 2-OG, ATP e ADP

A determinação das constantes de dissociação de efetores ATP, ADP e 2-OG à proteína GlnK foi realizada por microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Para isso, foi usado um microcalorímetro VP-ITC (Microcal Inc.). Todas as medições foram feitas a 20°C. A proteína GlnK purificada como descrito no ítem 4.10.2 foi dialisada contra tampão contendo 50 mmol/L Tris-Cl pH8,0, 50mmol/L NaCl e 10 mmol/L de $MgCl_2$.

Todos os tampões foram filtrados antes do uso. A concentração de titulante (ATP, ADP ou 2-OG) usada foi de 3 mmol/L. A concentração de proteína foi de 100 µmol/L. As soluções titulantes foram preparadas no mesmo tampão em que a proteína foi dialisada para a análise. A análise dos resultados e a remoção das linhas de base de cada experimento foram realizadas pelo programa Origin 5.0 (Microcal).

4.16 Medições de Dicroísmo Circular (CD)

As medições de CD da proteína GlnK de *H. seropedicae* foram feitas em um espectropolarímetro Jasco J-810 utilizando cubetas de 1mm de caminho ótico em água. A concentração final de proteína foi de 30 μmol/L. Os dados foram expressos como elipsidade molar ([θ]), que foi calculada através da seguinte fórmula:

$$([\theta]) = \frac{\theta}{10.l.C}$$

Onde θ é elipsidade em miligraus, medida pelo aparelho, l é a espessura do caminho ótico e C é a concentração da proteína em mol/L.

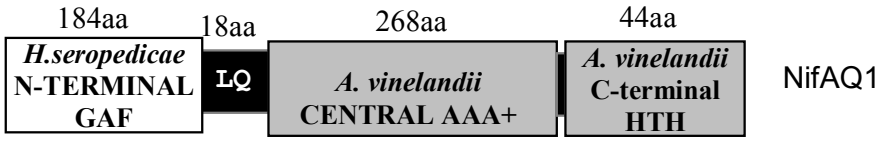
Os espectros de varredura da proteína foram obtidos a 25°C nos comprimentos de onda entre 180 e 260 nm. Os ensaios de desnaturação foram feitos com o comprimento de onda de 222 nm e temperatura entre 50 e 105°C e os resultados foram normalizados dividindo todos os valores de elipsidade pelo maior valor encontrado.

5. Resultados e Discussão

5.1 Efeito do oxigênio na atividade *in vivo* das proteínas quiméricas NifAQ1 e NifAQ2

A proteína NifA de *A. vinelandii* é insensível aos níveis de oxigênio (Dixon & Kahn, 2004), enquanto a de *H. seropedicae* é inativada na presença desse elemento (Souza *et al*,1999). Para verificar o efeito do oxigênio sobre diferentes domínios de NifA foram testadas duas proteínas NifA quiméricas: uma com o domínio GAF da NifA de *H. seropedicae* e o AAA+ e C-terminal de *A. vinelandii* (NifAQ1) e outra com o domínio GAF de *A. vinelandii* e o AAA+ e C-terminal de *H. seropedicae* (NifAQ2) (Oliveira *et al*, 2009). Um esquema ilustrando as duas proteínas quiméricas utilizadas está mostrado na figura 7. O resultado da atividade transcricional *in vivo* das proteínas quiméricas está mostrado na Tabela 2.

A.



B.

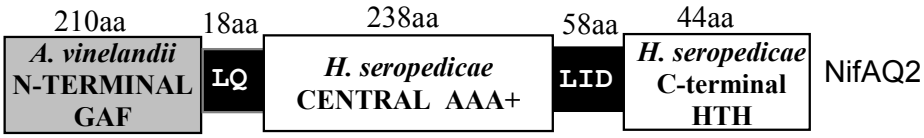


FIGURA 7 – MODELO ESQUEMÁTICO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NifAQ1 e NifAQ2. **A -** Representação esquemática da proteína quimérica NifAQ1, contendo o N-terminal GAF da NifA de *H. seropedicae* e os domínios AAA+ e C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*. **B-** Representação esquemática da proteína quimérica NifAQ2, contendo o N-terminal GAF da proteína NifA de *A. vinelandii* e os domínios AAA+ e C-terminal da NifA de *H. seropedicae*.

Tabela 2 – Efeito do oxigênio na atividade das proteínas NifAQ1 e NifAQ2

Plasmídeos	Proteína expressa	Expressão da fusão *nifH::lacZ* em condições aeróbicas (atividade de β-galactosidase – Unidades Miller)	Expressão da fusão *nifH::lacZ* em condições anaeróbicas (atividade de β-galactosidase – Unidades Miller)
pRT22		0	0
pRT22/pRAM2	$NifA_{(202-542)}$	0	1775
pRT22/pRAM14	NifAQ1	14875	15000
pRT22/pRAM18	NifAQ2	0	1527

Os dados correspondem à média de três experimentos independentes. Em todos os casos foi utilizada a estirpe ET8000 de *E. coli* crescida em meio NFDM contendo 20mmol/L de amônio, na presença ou ausência de oxigênio como indicado.

Os resultados observados na tabela 2 permitem concluir primeiramente que as proteínas quiméricas são capazes de ativar a transcrição a partir do promotor *nifH* de *K. pneumoniae.* A proteína NifAQ1 foi ativa tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, enquanto que a NifAQ2 se comportou de modo semelhante a proteína NifA de *H. seropedicae*, apresentando atividade apenas na ausência de oxigênio. Esse resultado indica que o domínio GAF da proteína NifA de *H. seropedicae* não está associado à sensibilidade ao oxigênio da proteína NifA, já que a quimera NifAQ1 é insensível ao oxigênio e a quimera NifAQ2 foi inativada na presença de oxigênio. Este resultado está em concordância com estudos realizados anteriormente com outras proteínas NifA sensíveis à oxigênio (Huala & Ausubel, 1989; Screen *et al*, 1994).

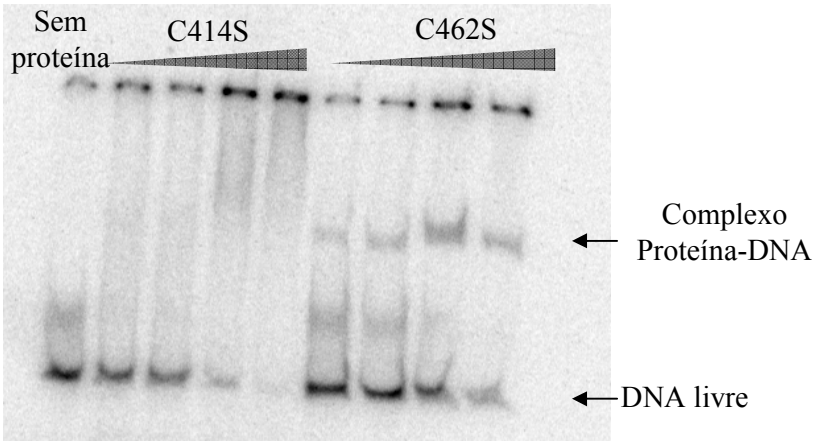
O alinhamento entre os aminoácidos de proteínas NifA de diferentes organismos revela que o domínio GAF possui uma baixa similaridade, em contraste com os domínios AAA+ e C-terminal, que são altamente conservados. A única porção dos domínios AAA+ e C-terminal que não é conservada em todas as proteínas NifA é a região interdomínios, que é ausente em proteínas NifA insensíveis ao oxigênio, como a NifA de *A. vinelandii*.

Portanto, esse resultado corrobora com a hipótese do motivo conservado de cisteínas da região interdomínios ser o sítio de sensibilidade da proteína ao oxigênio. Por isso, torna-se importante descrever o papel regulatório que o motivo conservado de cisteínas exerce sobre a proteína NifA de *H. seropedicae*.

5.2 Atividade de ligação ao promotor *nifB* das proteínas $NifA_{(202-542)}$ C414S, $NifA_{(202-542)}$C426S, $NifA_{202-542)}$C446S e $NifA_{202-542)}$C451S

Recentemente foi demonstrado que mutações sítio dirigidas no motivo conservado de cisteínas da proteína NifA de *H. seropedicae* (C414S, C426S, C446S e C451S) levam a perda da capacidade de ativação de transcrição *in vivo* (Oliveira *et al*, 2009). Esses resultados sugerem que um ou mais eventos do processo de ativação da transcrição, que vai desde a ligação ao DNA pela proteína ativadora, até a formação do complexo aberto, é afetado por essas mutações. As quatro proteínas NifA mutantes (C414S, C426S, C446S e C451S) foram purificadas, e a atividade de ligação destas proteínas ao promotor *nifB* marcado radioisotopicamente com [^{32}P] foi avaliada. A migração do DNA em gel de poliacrilamida na ausência e na presença das proteínas mutantes está mostrada na figura 8 (A e B).

A.



B.

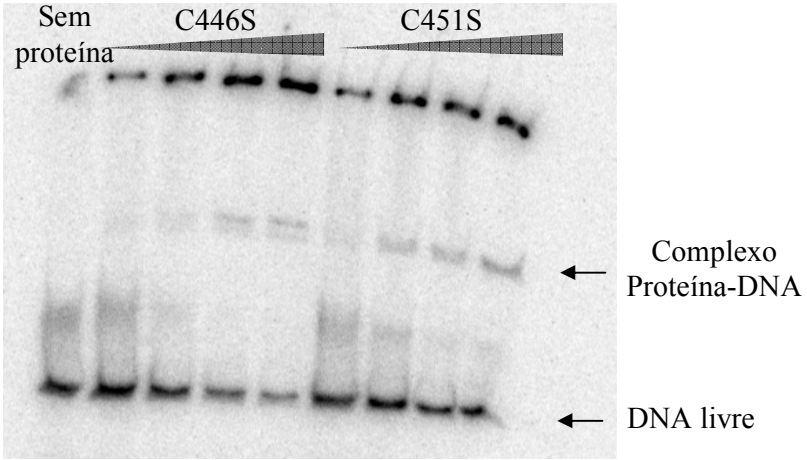


FIGURA 8 – LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS NifA MUTANTES AO PROMOTOR *nifB in vitro.* Ligação das proteínas NifA mutantes com cada uma das cisteínas do motivo conservado substituída por serina ao promotor *nifB* de *H. seropedicae*. O DNA foi marcado com [^{32}P] e incubado com concentrações crescentes de proteína (0,6, 1,2, 3,6 e 6 µM de monômero), na presença de 1 µg de DNA de Timo. A reação foi corrida em um gel 5% de poliacrilamida Tris-Glicina não desnaturante. **A** – Migração do DNA na presença das proteínas $NifA_{(202-542)}$-C414S e $NifA_{(202-542)}$-C426S. **B -** Migração do DNA na presença das proteínas $NifA_{(202-542)}$-C446S e $NifA_{(202-542)}$-C451S.

Como pode ser observado, as proteínas mutantes no motivo conservado de cisteínas foram capazes de se ligar a região promotora do gene *nifB*. Todas as reações continham DNA de timo, o que confirma a especificidade da ligação. Monteiro e colaboradores (1999a) demonstraram que a proteína $NifA_{(202-542)}$ é capaz de se ligar ao promotor *nifB in vitro,* quando purificada na presença de oxigênio, com uma constante de dissociação (Kd) de aproximadamente 2 μM. Através de análise densitométrica foi possível estimar o Kd das proteínas mutantes, que foi entre 2 e 4 μM. Portanto podemos inferir que a deficiência na transcrição *in vivo* observada para esses mutantes (Oliveira *et al*, 2009) não parece ser uma conseqüência de uma alteração na afinidade dessas proteínas pelas sequências-alvo UAS do DNA. Também podemos sugerir que as proteínas mutantes são semelhantes à proteína selvagem purificada na presença de oxigênio, que pode ser inativa devido à oxidação do *cluster* metálico.

O aminoácido serina foi escolhido para substituir as cisteínas do motivo conservado devido à alta similaridade entre esses dois aminoácidos. Isso para tentar minimizar eventuais efeitos estruturais da substituição. No entanto, se as cisteínas estão de fato envolvidas na coordenação de ferro, a substituição de qualquer cisteína do motivo conservado por serina iria impedir a formação do *cluster* metálico. De acordo com essa hipótese, quando o *cluster* não está formado, a proteína NifA permanece na forma inativa, como observado nos experimentos *in vivo*.

O fato dos mutantes no motivo conservado de cisteínas ainda terem a capacidade de se ligar ao DNA, como a proteína selvagem purificada na presença de oxigênio, é concordante com a observação que apenas o motivo C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* (sem o motivo conservado de cisteínas) é requerido para essa função (Monteiro *et al*, 2003b). Além disso, uma versão truncada da proteína NifA de *S. meliloti*, sem o domínio C-terminal de ligação ao DNA, foi capaz de ativar a transcrição e reteve a sensibilidade ao oxigênio (Huala & Ausubel, 1989). No entanto, experimentos de *footprinting in vivo* mostraram que a ligação da proteína NifA de *B. japonicum* ao elemento UAS do DNA no promotor do gene *nifD* diminuiu em resposta ao oxigênio (Morret *et al*, 1991). Essas discrepâncias talvez possam ser racionalizadas em termo de diferenças da estabilidade *in vivo* das várias proteínas comparadas.

5.3 Purificação da proteína NifA$_{(202-502)}$ de *H. seropedicae* em atmosfera livre de oxigênio

A purificação da proteína em atmosfera não oxidante foi realizada no interior de uma *glove box* contendo uma atmosfera de nitrogênio e concentração máxima de oxigênio de 8ppm. Todos os tampões e soluções utilizados na purificação foram borbulhados com nitrogênio e deixados em frascos abertos no interior da *glove box* por pelo menos 24 horas. As proteínas solúveis obtidas como descrito no item 4.10.3 foram injetadas em coluna Hi-Trap Heparina de 5 mL (GE Healthcare) e eluídas em gradiente de NaCl até 1M. As proteínas coletadas da coluna de Heparina foram diluídas para ficarem novamente em baixa concentração de sal e injetadas em coluna Hi-Trap Q-Sepharose (GE Healthcare). Como pode ser visualizado na figura 9, a proteína não foi completamente purificada, sendo evidente a presença de várias proteínas contaminantes. No entanto, a proteína parcialmente purificada foi utilizada para o experimento de detecção de ferro.

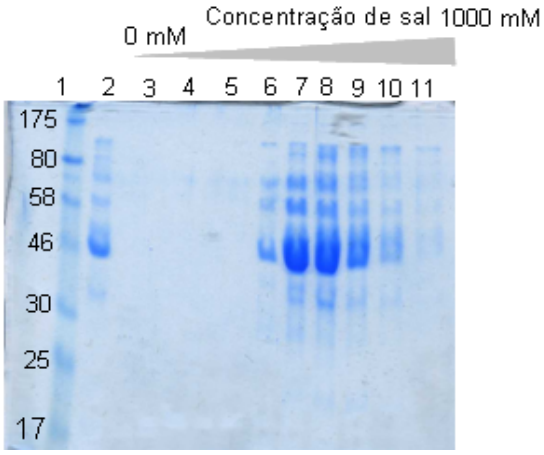


FIGURA 9 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA $NifA_{(202-542)}$ DE *H. seropedicae* EM ATMOSFERA LIVRE DE OXIGÊNIO. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da proteína $NifA_{(202-542)}$ parcialmente purificada em atmosfera livre de oxigênio. A linha 1 contém o marcador de massa molecular com as bandas contendo as respectivas massas em KDa. A linha 2 mostra as proteínas que foram injetadas na coluna. As linhas 3 a 11 mostram as frações eluídas no gradiente de sal.

5.4 Análise espectrofotométrica da proteína $NifA_{(202-542)}$ parcialmente purificada em anaerobiose

A proteína parcialmente purificada em anaerobiose, mostrada na Figura 9 foi submetida à espectrofotometria de absorção UV-visível para verificar o conteúdo de ferro da amostra.

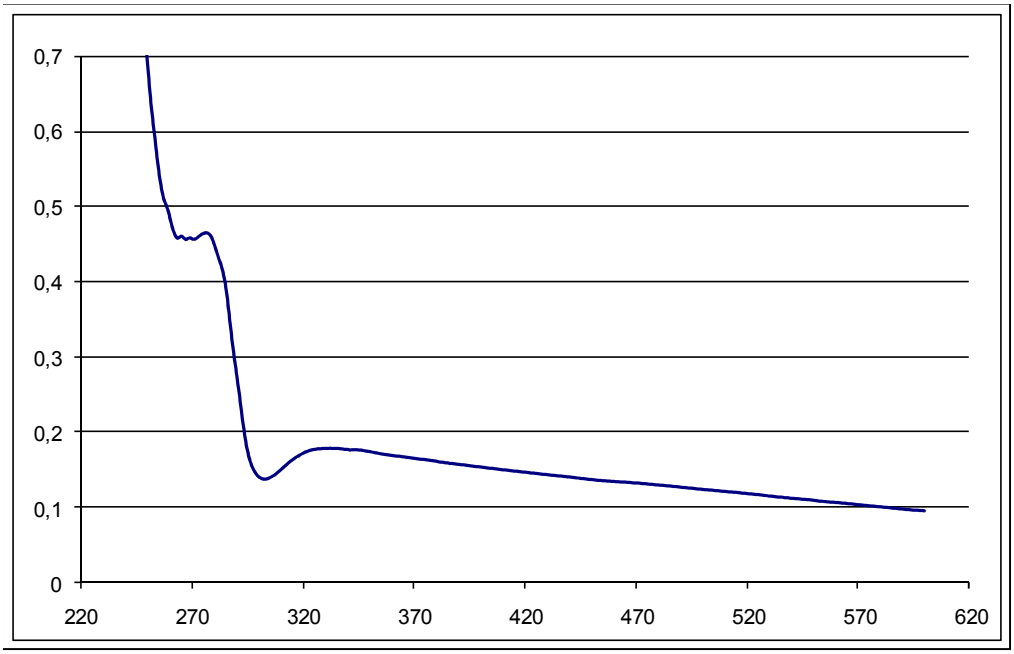


FIGURA 10 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE LUZ DA PROTEÍNA NifA DE *H. seropedicae* PARCIALMENTE PURIFICADA EM ATMOSFERA LIVRE DE OXIGÊNIO. Espectro de absorção de luz visível a UV da proteína $NifA_{(202-542)}$ de *H. seropedicae* parcialmente purificada em atmosfera livre de oxigênio. A abscissa corresponde ao comprimento de onda (nm) e a ordenada a absorbância.

Na figura 10 podemos verificar que não existe nenhum pico de absorção acima de 300 nm. No padrão do espectro esperado para uma proteína contendo um cluster Ferro-enxofre seria evidente um pico de absorbância na região próxima a 420 nm. Esse padrão não foi encontrado na proteína parcialmente purificada na ausência de oxigênio, indicando que a preparação não continha proteínas Ferro-enxofre. Esse resultado foi reproduzido inúmeras vezes, mostrando que de fato a proteína, quando purificada, não possui indicação de cluster. Esse resultado pode ter várias implicações. Primeiro, é provável que o material de partida não possuísse o cluster. Isso poderia estar relacionado com a ineficiência da estirpe de *E. coli* na qual a proteína foi super expressa de montar o cluster. Uma solução para esse possível problema, que será testada futuramente, será a co-expressão de proteínas montadoras de cluster, como as proteínas NifU e NifS ou IscU e IscS. Outra possibilidade que

precisa ser considerada é a do cluster estar sendo perdido durante as etapas cromatográficas. Por isso, pretende-se testar outras formas de purificação da proteína no interior da *glove box*.

5.5 Interação *in vitro* entre o domínio GAF da proteína NifA e a proteína GlnK de *H. seropedicae*

Em várias bactérias nas quais a atividade da proteína NifA não é regulada por NifL tem sido descrito um papel regulatório das proteínas do tipo PII em resposta aos níveis de amônio. Em *A. brasilense*, a forma uridililada de GlnB é requerida para ativar NifA em condições limitantes de nitrogênio (Arsene *et al*, 1996; Araujo *et al*, 2004). Arsene e colaboradores (1999) demonstraram que a mutação Tyr18 do domínio GAF da proteína NifA de *A. brasilense* produziu uma NifA que não requer GlnB. No entanto, esse trabalho não mostrou que as proteínas GlnB e NifA poderiam formar um complexo. Em *R.rubrum* GlnB também é capaz de ativar NifA em baixos níveis de nitrogênio (Zhang *et al*, 2004). Já o mecanismo encontrado para a proteína NifA de *R. capsulatus* é diferente, já que em uma estirpe mutante *glnB*$^-$*/glnK*$^-$ desse organismo a proteína NifA não apresentou regulação pelos níveis de amônio (Drepper *et al*, 2003). Ensaios de duplo-híbrido realizados em levedura mostraram que as proteínas PII são capazes de interagir diretamente com NifA de *R. capsulatus* (Pawlowski *et al*, 2003). Ao contrário da proteína NifA de *A. brasilense,* na qual a deleção do domínio N-terminal tornou a proteína NifA ativa e tolerante a amônia, mutantes NifA1 de *R. capsulatus* que tiveram o domínio N-terminal eliminado total ou parcialmente, tornaram-se completamente inativos (Paschen *et al*, 2001), indicando que o domínio N-terminal é essencial para a atividade da NifA neste microrganismo. Em *A. caulinodans*, as proteínas GlnB e GlnK também estão envolvidas na inibição da atividade da proteína NifA na presença de íons amônio e tanto GlnB quanto GlnK podem controlar esta atividade. Neste organismo, assim como acontece em *R. capsulatus*, a proteína NifA N-truncada é inativa (Michel-Reydellet & Kaminski, 1999). Portanto, as proteínas PII parecem ser responsáveis por inibir a atividade de NifA em *R. capsulatus* e *A. caulinodans*, enquanto que em *A. brasilense* e *R. rubrum* parecem ser responsáveis por ativar NifA na ausência de nitrogênio fixado.

Em *H. seropedicae*, na estirpe *glnK*$^{-}$ a proteína NifA não apresenta atividade, indicando que GlnK é essencial para a atividade de NifA (Noindorf, 2006). Resultados ainda não publicados mostram que a proteína quimérica NifAQ1 (Figura 7A) é regulada por nitrogênio apenas na presença da proteína GlnK de *H. seropedicae* ou *E. coli* (Aquino *et al*, dados não publicados). Portanto, a presença da proteína GlnK é essencial para a função regulatória do domínio GAF e para a atividade da proteína NifA. Esses resultados sugerem que o domínio GAF e a proteína GlnK possam interagir. Para testar a interação *in vitro*, essas proteínas foram purificadas de acordo com o descrito no item 4.10 e submetidas a um ensaio de proteólise limitada por tripsina. Os resultados obtidos nesses experimentos são mostrados nas Figuras 11 e 13. A Figura 12 mostra um controle do experimento realizado com a proteína NifA de *A. vinelandii* e a proteína GlnK de *H. seropedicae*.

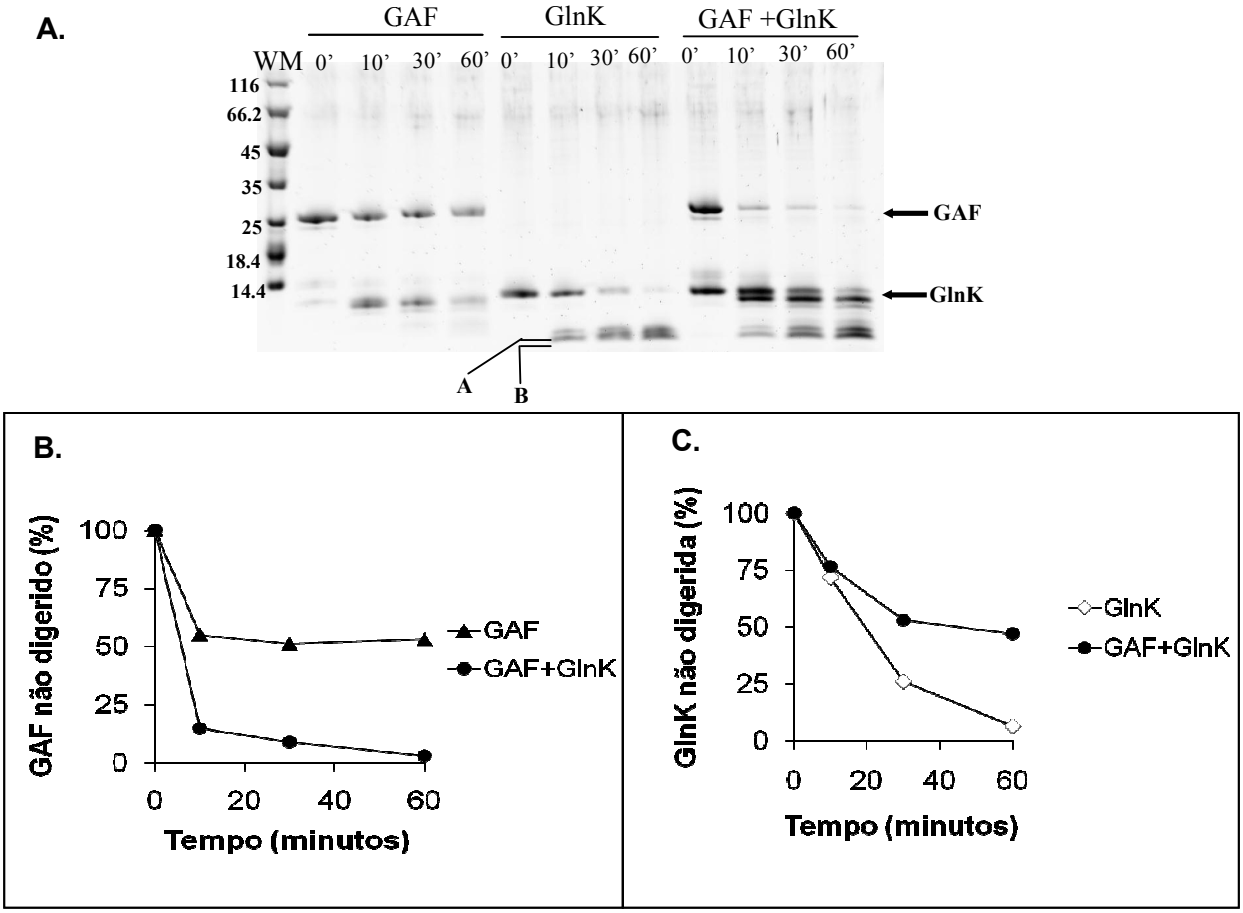


FIGURA 11 – EFEITO DO DOMÍNIO GAF NA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA E DA PROTEÍNA GlnK. Proteólise limitada do domínio GAF na presença e ausência da proteína GlnK de *H. seroepedicae*. As reações foram realizadas de acordo com o descrito na seção Materiais e Métodos (item 4.14), corridas em gel de poliacrilamida Tris-Tricina e coradas com SYPRO Ruby (Invitrogen). **A –** A primeira linha contém o indicador de massa molecular com as respectivas massas em kDa (Fermentas). Cada linha mostra o padrão de proteólise até o indicado tempo. As bandas correspondentes às proteínas não digeridas são apontadas por flechas. As duas bandas de degradação da proteína GlnK são marcadas como A e B. **B –** Análise quantitativa da degradação do domínio GAF. A porcentagem de GAF não digerido foi determinada por análise densitométrica. As reações continham apenas GAF (triângulos fechados) ou GAF na presença de GlnK (círculos fechados). **C –** Análise quantitativa da degradação de GlnK, da mesma forma que o descrito para GAF em B. As reações continham apenas GlnK (losangos abertos) ou GlnK na presença de GAF (círculos fechados).

O ensaio de proteólise mostrado na Figura 11 mostra uma baixa digestão do domínio GAF isoladamente, com cerca de 50% ainda não digerido após 60 minutos de reação. A proteína GlnK, pelo contrário, foi quase totalmente digerida no mesmo tempo (aproximadamente 97%), gerando duas bandas de degradação (bandas A e B). No entanto, quando as duas proteínas foram misturadas, a extensão da degradação das mesmas mudou. Nessa reação o domínio GAF foi rapidamente digerido, com degradação total em 60 minutos, enquanto que GlnK foi menos digerida, com cerca de 50% de proteína não digerida ao final do experimento. Esse resultado pode ser interpretado como sendo produto de mudanças conformacionais nas duas proteínas quando combinadas, sugerindo uma interação física. Provavelmente a interação entre as duas proteínas causa um aumento da exposição de sítios de reconhecimento da tripsina no domínio GAF da proteína NifA e uma concomitante diminuição da exposição dos mesmos sítios na proteína GlnK. O experimento controle mostrado na Figura 12 mostra que esse efeito visto na mudança do padrão cinético de tripsinólise é específico, já que não houve diferença no padrão de digestão quando foram testadas as proteínas NifA de *A. vinelandii* e GlnK de *H. seropedicae*.

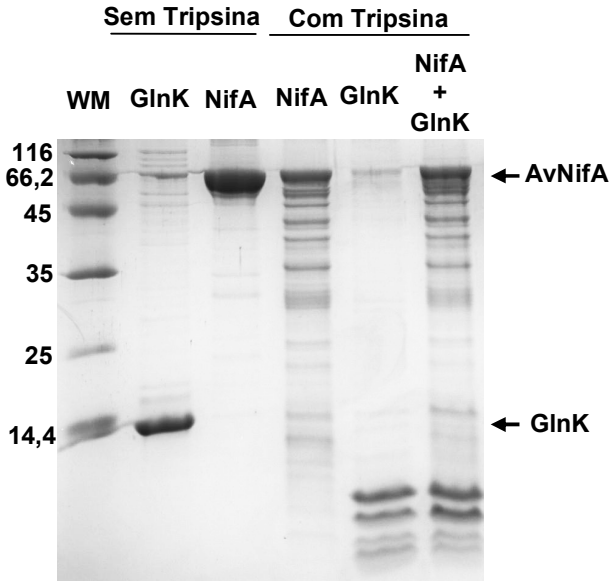


FIGURA 12 – EFEITO DA PROTEÍNA NifA DE *A. vinelandii* NA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA E DA PROTEÍNA GlnK. Proteólise limitada da proteína NifA de *A. vinelandii* na presença e ausência da proteína GlnK não modificada de *H. seropedicae*. As reações foram realizadas como descrito na seção Materiais e Métodos, interrompidas após 60 minutos com tampão de amostra a quente e corridas em gel de poliacrilamida Tris-Tricina, que foi corado com corante SYPRO Ruby (Invitrogen). **A -** A primeira linha contém o indicador de massa molecular com as respectivas massas em kDa (Fermentas). As duas primeiras linha*s* mostram as proteínas sem adição de tripsina. As linhas subsequentes mostram o padrão de proteólise das proteínas NifA de *A. vinelandii*, GlnK de *H. seropedicae* e das duas proteínas juntas. As bandas correspondentes às proteínas não digeridas são apontadas por flechas.

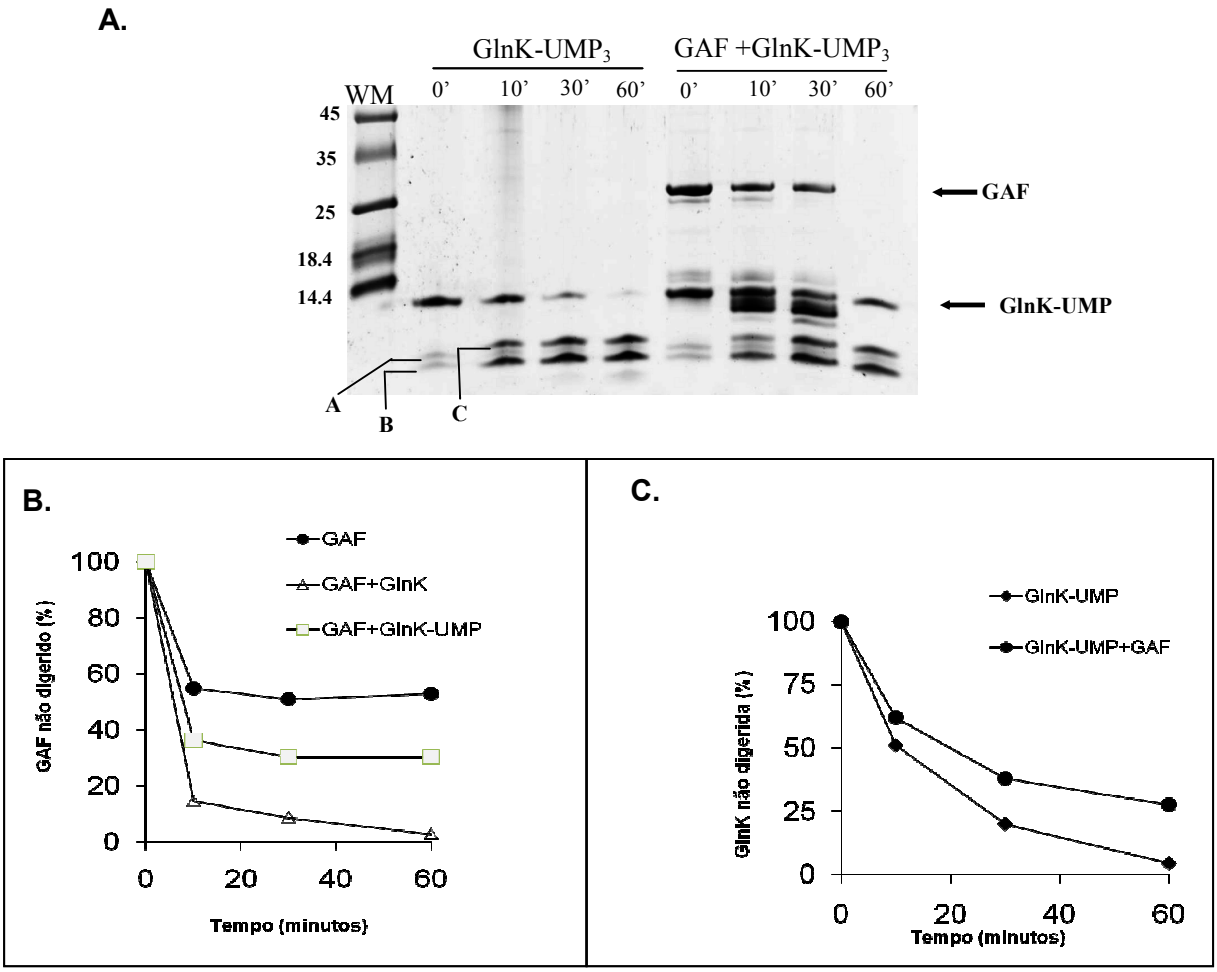


FIGURA 13 – EFEITO DO DOMÍNIO GAF NA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA E DA PROTEÍNA GlnK-UMP_3. Proteólise limitada do domínio GAF na presença e ausência da proteína GlnK-UMP_3 de *H. seropedicae*. As reações foram realizadas com descrito na seção Materiais e Métodos (item 4.14) e corridas em gel de poliacrilamida Tris-Tricina, que foi corado com corante SYPRO Ruby (Invitrogen). **A -** A primeira linha contém o indicador de massa molecular com as respectivas massas em KDa (Fermentas). Cada linha mostra o padrão de proteólise até o indicado tempo. As bandas correspondentes às proteínas não digeridas são apontadas por flechas. As bandas de degradação de GlnK-UMP_3 foram apontadas como A, B e C. **B –** Análise quantitativa da degradação do domínio GAF. A porcentagem de GAF não digerido foi determinada por análise densitométrica. As reações continham apenas GAF (círculos fechados), GAF na presença de GlnK (triângulos abertos) ou GAF na presença de GlnK-UMP_3 (quadrados abertos). **C-** Análise quantitativa da degradação da proteína GlnK-UMP_3. A porcentagem de GlnK-UMP_3 não digerida foi determinada por análise densitométrica. As reações continham apenas GlnK-UMP_3 (losangos fechados) e GlnK-UMP_3 na presença de GAF (círculos fechados).

A proteólise da proteína GlnK uridililada (GlnK-UMP_3) teve um padrão diferente daquele observado para a proteína GlnK não modificada (Figuras 11 e 13). Na tripsinólise da proteína GlnK-UMP_3, uma nova banda foi identificada (banda C). Além disso, a banda B teve um enriquecimento quando comparado com a proteína não modificada, enquanto a banda A teve uma menor abundância, e permaneceu constante durante o tempo. Esses resultados mostraram que a mudança conformacional motivada pela uridililação é capaz de expor diferentes sítios de reconhecimento da tripsina nessa proteína.

A adição do domínio GAF à proteína GlnK-UMP_3 também permitiu identificar uma interação proteína-proteína. Nessa reação, GlnK-UMP_3 na ausência de GAF foi quase totalmente digerida após 60 minutos, e na presença de GAF cerca de 30% de proteína ainda permanecia não digerida após o mesmo tempo. Além disso, a extensão da digestão de GAF também aumentou na presença de GlnK-UMP_3, com apenas 10% de proteína não digerida após 60 minutos. No entanto, a extensão de digestão do domínio GAF na presença de GlnK-UMP_3 foi menor do que a digestão na presença de GlnK não modificada (Figura 13B). Esse resultado sugere que a proteína GlnK-UMP_3 parece ligar menos efetivamente ao domínio GAF do que a GlnK não modificada.

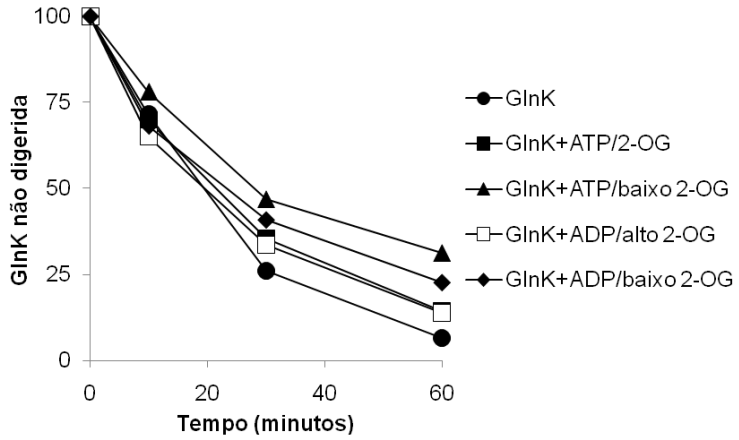
A proteína GlnK é uridililada pela proteína GlnD na presença de glutamina em condições limitantes de nitrogênio. Os presentes resultados mostram que tanto a forma uridililada quanto a não uridililada de GlnK interagem com o domínio GAF, no entanto GlnK-UMP_3 parece interagir menos eficientemente com o domínio GAF da proteína NifA do que a GlnK não modificada. O efeito de mudança conformacional disparado pela uridililação de GlnK deve, a princípio, resultar em uma NifA transcricionalmente ativa.

As evidências mostradas aqui dão suporte para a hipótese de que a atividade de NifA de *H. seropedicae* é regulada por seu domínio GAF, dependendo dos níveis de nitrogênio, que são transduzidos para o GAF pela formação do complexo com GlnK. Em choque de amônio, GlnK não uridililada teria um efeito inibitório sobre NifA. Quando o nível de nitrogênio fixado diminui, a proteína GlnK é uridililada. A modificação covalente de GlnK induz uma mudança conformacional no domínio GAF, o que leva a liberação do domíno catalítico, permitindo a expressão dos genes *nif*. Portanto, pode-se elaborar um

modelo no qual existem três diferentes conformações de NifA *in vivo*: NifA-GlnK, que é inativa; NifA-GlnKUMP$_3$; que é transcricionalmente ativa; e NifA livre (recém-sintetizada), que é inativa e requer GlnK-UMP$_3$ para ativação.

Ensaios de proteólise limitada também foram utilizados para demonstrar a interação entre as proteínas NifL e GlnK de *Azotobacter vinelandii* (Little *et al*, 2002) nos quais foi encontrada uma diferença na taxa de digestão da proteína NifL na presença da proteína GlnK. Nesse trabalho, o experimento de proteólise limitada permitiu observar o efeito dos efetores ATP e 2-OG (Little *et al*, 2002). O complexo GlnK-GAF de *H. seropedicae* também pode eventualmente responder a efetores metabólicos para permitir um ajuste fino da atividade da proteína NifA. Com o objetivo de demonstrar o efeito de efetores que comumente são relacionados com a modulação da interação das proteínas PII com proteínas alvo, os experimentos de proteólise limitada foram repetidos com uma combinação de nucleotídeos de adenosina (ATP ou ADP) com altos ou baixos níves de 2-OG. Os resultados desses experimentos estão mostrados nas Figuras 15 e 16. A Figura 14 mostra o efeito das combinações de moléculas efetoras utilizadas nas proteínas GlnK e GlnK-UMP$_3$.

A.



B.

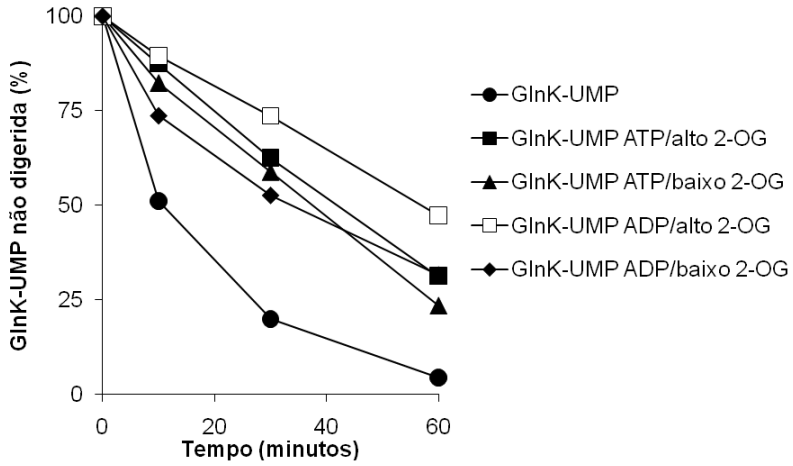


FIGURA 14 – EFEITO DE ATP, ADP E 2-OG NA EXTENSÃO DA DIGESTÃO PROTEOLÍTICA DAS PROTEÍNAS GlnK E GlnK-UMP_3 DE *H. seropedicae.* Análise quantitativa da degradação de GlnK feita por densitometria das bandas correspondentes à proteína GlnK não digerida dos géis de poliacrilamida Tris-Tricina nos quais foram corridas as reações de proteólise limitada. ATP e ADP foram adicionados na concentração final de 3,5 mmol/L, alto 2-OG 2 mmol/L e baixo 2-OG 100 µmol/L. Os gráficos mostram a percentagem de proteína não digerida nas seguintes condições: ausência de efetores (círculos fechados), ATP combinado com alto 2-OG (quadrados fechados), ATP combinado com baixo 2-OG (triângulos fechados), ADP combinado com alto 2-OG (quadrados abertos) ou ADP combinado com baixo 2-OG (losangos fechados). **A –** Extensão da digestão de GlnK não modificada. **B –** Extensão da digestão de GlnK-UMP_3.

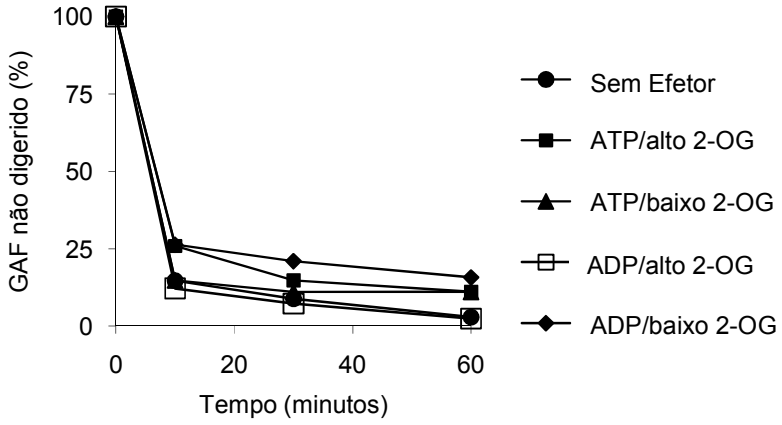


FIGURA 15 – EFEITO DE ATP, ADP E 2-OG NA EXTENSÃO PROTEOLÍTICA DO DOMÍNIO GAF NA PRESENÇA DA PROTEÍNA GlnK. Análise quantitativa da degradação de GAF na presença de GlnK não modificada feita por densitometria das bandas das proteínas não digeridas dos géis de poliacrilamida Tris-Tricina nos quais foram corridas as reações de proteólise limitada. ATP e ADP foram adicionados na concentração final de 3,5 mmol/L, alto 2-OG 2mmol/L e baixo 2-OG 100 µmol/L. O gráfico mostra a percentagem de proteína não digerida nas seguintes condições: ausência de efetores (círculos fechados), ATP combinado com alto 2-OG (quadrados fechados), ATP combinado com baixo 2-OG (triângulos fechados), ADP combinado com alto 2-OG (quadrados abertos) ou ADP combinado com baixo 2-OG (losangos fechados).

A.

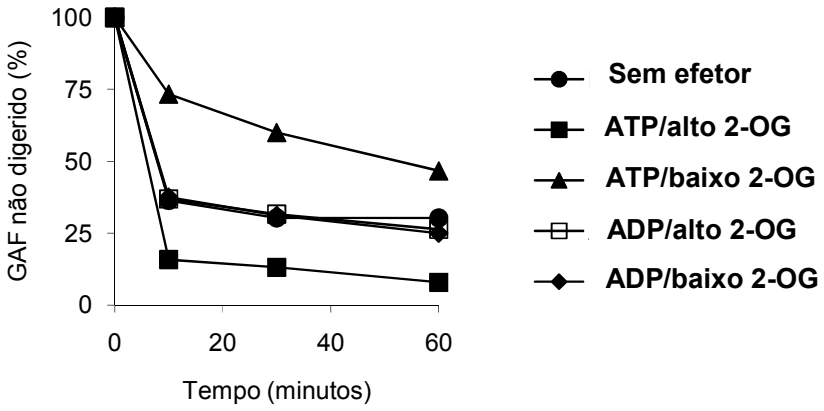


FIGURA 16 – EFEITO DE ATP, ADP E 2-OG NA EXTENSÃO PROTEOLÍTICA DO DOMÍNIO GAF NA PRESENÇA DE GlnK-UMP_3. Análise quantitativa da degradação de GAF na presença de GlnK-UMP_3 feita por análise densitométrica das bandas das proteínas não digeridas dos géis de poliacrilamida Tris-Tricina nos quais foram corridas as reações de proteólise limitada. ATP e ADP foram adicionados na concentração final de 3,5 mmol/L, alto 2-OG 2 mmol/L e baixo 2-OG 100 µmol/L. O gráfico mostram a percentagem de proteína não digerida nas seguintes condições: ausência de efetores (círculos fechados), ATP combinado com alto 2-OG (quadrados fechados), ATP combinado com baixo 2-OG (triângulos fechados), ADP combinado com alto 2-OG (quadrados abertos) ou ADP combinado com baixo 2-OG (losangos fechados).

A proteína GlnK, nas formas não modificada e uridililada, tem seu padrão de digestão por tripsina alterado na presença das combinações de efetores utilizadas (Figura 14). O domíno GAF, por sua vez, não respondeu aos efetores quando submetido a digestão proteolítica por tripsina (dados não mostrados). Esses fatos fazem com que não seja adequado avaliar o efeito dos efetores observando mudanças na cinética de degradação de GlnK, mas sim de GAF.

A interação entre o domínio GAF e a proteína GlnK não modificada não foi afetada por nenhuma das combinações de efetores usadas (Figura 15). No entanto, a extensão proteolítica do complexo GAF/GlnK-UMP_3 parece ter respondido aos efetores (Figura 16). Na presença de ATP e alto 2-OG o domínio GAF foi mais rapidamente degradado, e na presença de ATP e baixo 2-OG foi menos suceptível a degradação do que o controle sem nenhum efetor (Figura 16). Esses resultados sugerem que na presença de ATP e alto 2-OG forma-se um complexo GAF/GlnK-UMP_3 mais estável, e quando os níveis de 2-OG diminuem a interação é mais fraca.

A modulação da interação entre proteínas PII e proteínas alvo por moléculas efetoras já é um efeito conhecido (Kamberov *et al*, 1995; Huergo *et al*, 2009; Durand & Merrick, 2006; Heirinch *et al*, 2006; Huergo *et al*, 2007; Wolfe *et al,* 2007). Esse fato, somado com a possibilidade de modificação pós-traducional, faz com que essas proteínas sejam capazes de sensoriar e integrar três sinais metabólicos diferentes: nitrogênio, energia e carbono, que são sinalizados respectivamente por glutamina, razão ATP/ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) (Arcondéguy *et al*, 2001). Os níveis de glutamina controlam a atividade GlnD, que catalisa a uridililação/desuridililação de PII. Já ATP e 2-OG podem regular a uridililação das proteínas PII ligando-se diretamente a elas, e não a GlnD (Kamberov *et al*, 1995; Jiang *et al*, 1998). Em *E. coli* a variação dos níveis de 2-OG não é suficiente para influenciar a modificação covalente de PII por GlnD, no entanto a ligação dessa molécula em PII é capaz de modular sua interação direta com proteínas-alvo (Jiang *et al*, 1998).

Os resultados mostrando a resposta do complexo GAF-GlnK-UMP_3 adicionam mais dados ao modelo de regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* em resposta à amônio que está sendo proposto aqui. A disponibilidade de nitrogênio tem um efeito direto na razão glutamina/2-OG

(Merrick & Edwards, 1995). Com alta disponibilidade de amônio, essa razão aumenta. Em condições limitantes de nitrogênio, os níveis de 2-OG aumentam, diminuindo a razão. Nessas condições, espera-se que a proteína NifA apresente alta atividade, que no nosso modelo significa um complexo mais estável entre o domínio GAF e a proteína GlnK-UMP_3 para permitir a atividade de NifA. No entanto, o complexo GAF-GlnK-UMP_3 parece responder a flutuações no status metabólico da célula, permitindo uma regulação fina da atividade de NifA. Essa resposta pode ser observada na maior afinidade do domínio GAF por GlnK-UMP_3 na presença de altos níveis de 2-OG. Dessa forma, pode-se sugerir que um pequeno aumento na concentração de 2-OG intracelular provocado pela diminuição na disponibilidade de nitrogênio fixado no ambiente leva a um aumento da afinidade de GlnK-UMP_3 pelo domínio GAF, aumentando a atividade de NifA. A figura 17 mostra um modelo da regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* que sumariza as idéias já expostas.

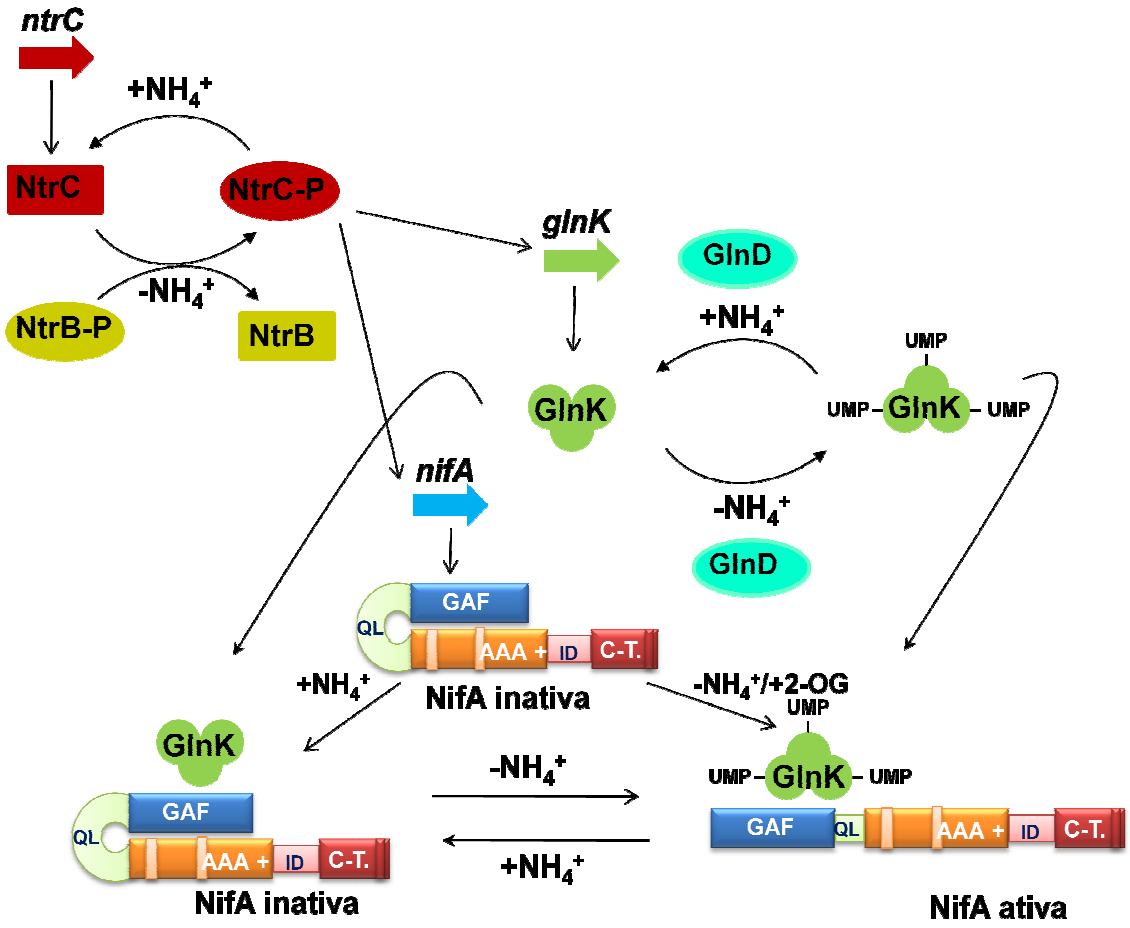


FIGURA 17 – MODELO DA REGULAÇÃO DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae* POR AMÔNIO. Esquema do modelo de regulação da proteína NifA de *H. seropedicae* em resposta aos níveis de amônio. A proteína NtrC fosforilada por NtrB ativa a transcrição dos genes *glnK* e *nifA*. A proteína NifA é sintetizada em uma forma inativa e para ser ativada precisa necessariamente interagir com GlnK uridililada, sendo que não apresenta atividade quando complexada com GlnK não modificada. GlnK é uridililada ou desuridililada pela proteína GlnD.

5.6 Efeito dos efetores ATP, ADP e 2-OG na estrutura secundária da proteína GlnK de *H. seropedicae*

Os resultados de interação entre o domínio GAF e a proteína GlnK indicam que os efetores parecem ter um papel importante na modulação da interação. Com o objetivo de observar mudanças conformacionais e de estabilidade na proteína GlnK promovidos pela ligação aos efetores metabólicos usados nos testes de interação com o domínio GAF da proteína NifA foi utilizada a técnica de Dicroísmo Circular (CD). A Figura 18 mostra o espectro de CD da proteína GlnK (30 µmol/L) em água ou na presença dos ligantes (0,3 mmol/L).

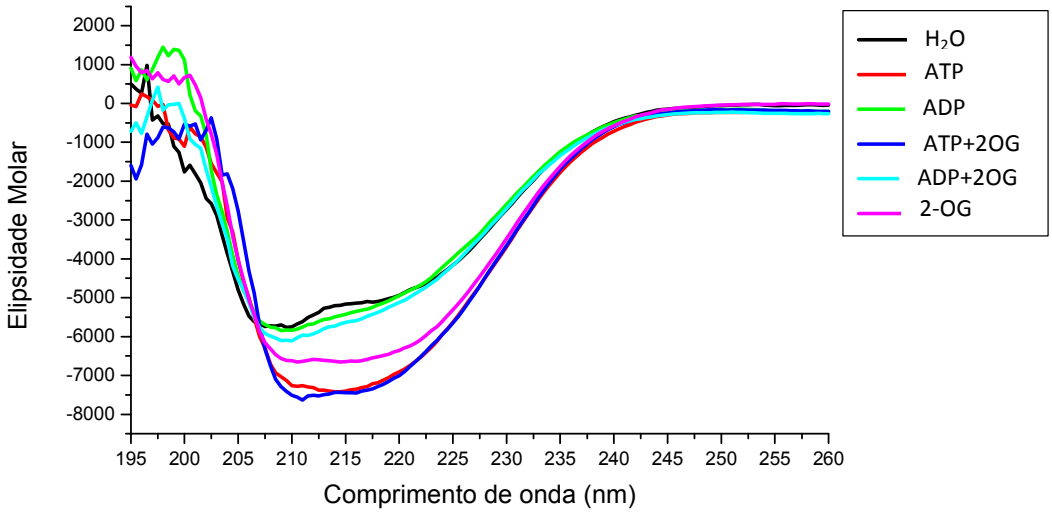


FIGURA 18 – ESPECTRO DE CD DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DOS EFETORES MOLECULARES. Os espectros da proteína GlnK de *H. seropedicae* (30 µmol/L) foram obtidos em água a 20°C. Cada espectro foi acumulado 10 vezes. O espectro de CD da proteína na presença de ATP, ADP, 2-OG e nas combinações ATP+2-OG e ADP+2-OG são mostrados. Todos os ligantes foram adicionados na concentração de 0,3 mmol/L. Os valores de elipsidade molar são dados em $deg.cm^2.dmol^{-1}$.

O formato dos espectros de CD da proteína GlnK mostrados na figura 18 são semelhantes, no entanto é possível perceber que na presença de ATP e ATP+2-OG parece existir uma diferença na conformação da proteína. Aparentemente a ligação de ATP à proteína provoca uma alteração na estrutura secundária da mesma. Um entendimento maior sobre o efeito da ligação do ATP na proteína GlnK de *H. seropedicae* poderá ser viabilizado com a determinação da estrutura cristalográfica da proteína na presença dos ligantes, o que será feito futuramente.

A técnica de CD também foi utilizada para demonstrar a estabilidade térmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* na presença dos ligantes. A Figura 19 mostra a elipsidade molar a 222 nm da proteína em função da temperatura (50 a 105°C).

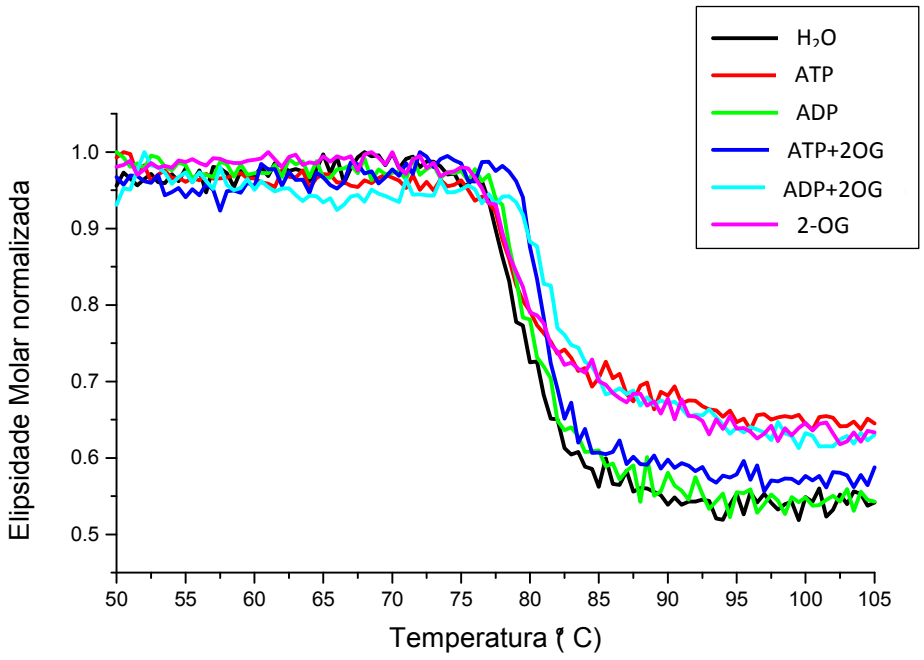


FIGURA 19 – ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DOS EFETORES METABÓLICOS. O sinal de CD foi coletado a 222 nm em função da temperatura. A elipsidade molar foi calculada como $deg.cm^2.dmol^{-1}$ e normalizada para que os valores máximos medidos em cada tratamento fossem igual a 1. Todos os ligantes foram adicionados na concentração de 0,3 mmol/L e a concentração final de proteína foi 30 µmol/L.

O gráfico de estabilidade térmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* mostra que o Tm (Temperatura de *melting* – temperatura na qual 50% das moléculas de proteína estão desnaturadas) dessa proteína em H_2O é de aproximadamente 80°C. Aparentemente a adição de ATP, ADP ou 2-OG não foi capaz de aumentar a estabilidade térmica da proteína. No entanto, quando foram testadas as combinações ATP + 2-OG e ADP + 2-OG foi possível observar um aumento na Tm de aproximadamente 2°C. Esse aumento mostra que a proteína GlnK de *H. seropedicae* de fato é capaz de ligar os efetores ATP, ADP e 2-OG, como já era esperado. Além disso, pode-se concluir que existe ligação concomitante de ATP e 2-OG e também de ADP e 2-OG, já que

a mudança na estabilidade só foi visualizada quando foram adicionadas as combinações dos efetores.

5.7 Determinação das constantes de ligação de ATP, ADP e 2-OG da proteína GlnK de *H. seropedicae*

As constantes de dissociação de ATP, ADP e 2-OG da proteína GlnK de *H. seropedicae* foram determinadas por ITC (*Isotermal Titration Calorimetry*). A técnica de ITC é baseada no fato de que todas as interações entre moléculas geram ou absorvem calor, que pode ser quantificado por um calorímetro altamente sensível. Para a medição, a biomolécula em estudo, no caso proteína, é colocada em uma célula e a solução que contém o ligante é colocada em uma seringa. Esta célula é isotérmica em relação a uma segunda célula, conhecida como célula de referência. Quando o ligante é injetado na célula contendo a proteína, o calorímetro detecta o calor que é absorvido ou liberado em conseqüência da interação. Isso é feito através da medição da energia necessária para manter a célula que contém a amostra em condições isotérmicas em relação à célula de referência (Pierce *et al*, 1999). As injeções são repetidas e como resultado é gerado um gráfico com picos de calor que diminuem a cada injeção, à medida que a proteína fica saturada. Uma vez que a titulação está completa, os picos são integrados por um *software* específico que gera um gráfico que relaciona o calor produzido ou absorvido por mol de ligante contra a razão molar da ligante:proteína. O *software* permite a escolha de um modelo de ligação e gera uma isoterma referente ao modelo escolhido. Manualmente é possível encontrar a isoterma com melhor sobreposição com os pontos encontrados experimentalmente. A regressão dessa isoterma fornece a variação de entalpia (ΔH) e constante de dissociação (K_d). Com esses dados o *software* calcula a variação de entropia (ΔS) (Roselin *et al*, 2010).

A proteína utilizada para os experimentos de ITC foi purificada como descrito no ítem 4.10.2 e dialisada contra um tampão contendo Tris-HCl 50mmol/L, NaCl 50 mmol/L e $MgCl_2$ 10 mmol/L. Os titulantes (ATP, ADP e 2-OG) foram preparados na concentração de 3 mmol/L. A concentração de proteína utilizada em todas as medições foi de 100 µmol/L. As titulações

isotérmicas da proteína GlnK com ATP, ADP, 2-OG e 2-OG na presença de ATP estão mostradas nas Figuras 20 a 23.

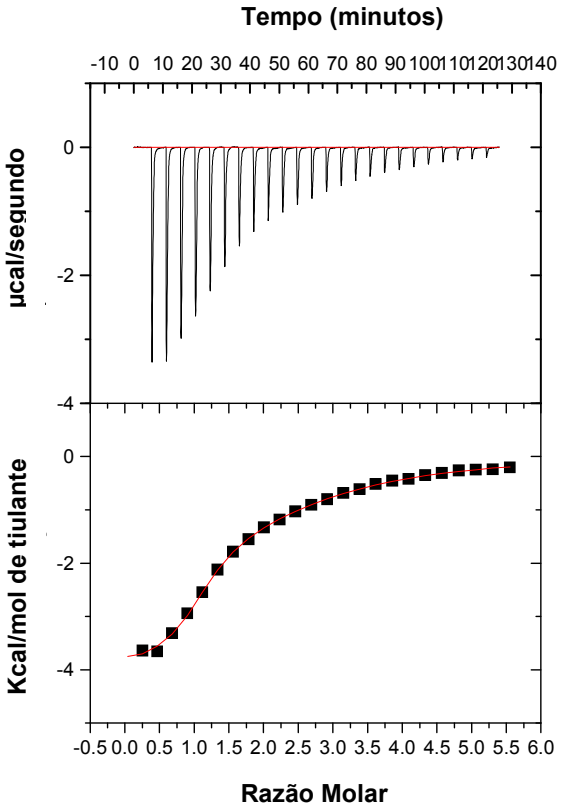


FIGURA 20 – TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* COM ATP. A titulação de GlnK com ATP foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína no experimento foi de 100 µmol/L e o titulante foi preprado a 3 mmol/L. A razão molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. O ajuste da curva sigmóide foi feito considerando que a proteína tem 3 sítios de ligação seqüenciais.

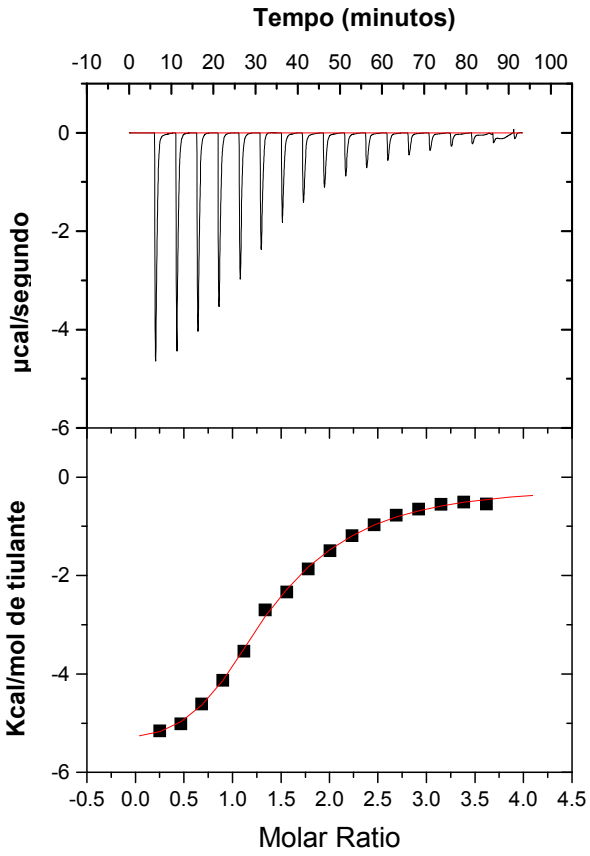


FIGURA 21 – TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* COM ADP. A titulação de GlnK com ADP foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína no experimento foi de 100 µmol/L e o titulante foi preprado a 3 mmol/L. A razão molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. O ajuste da curva sigmóide foi feito considerando que a proteína tem 3 sítios de ligação seqüenciais.

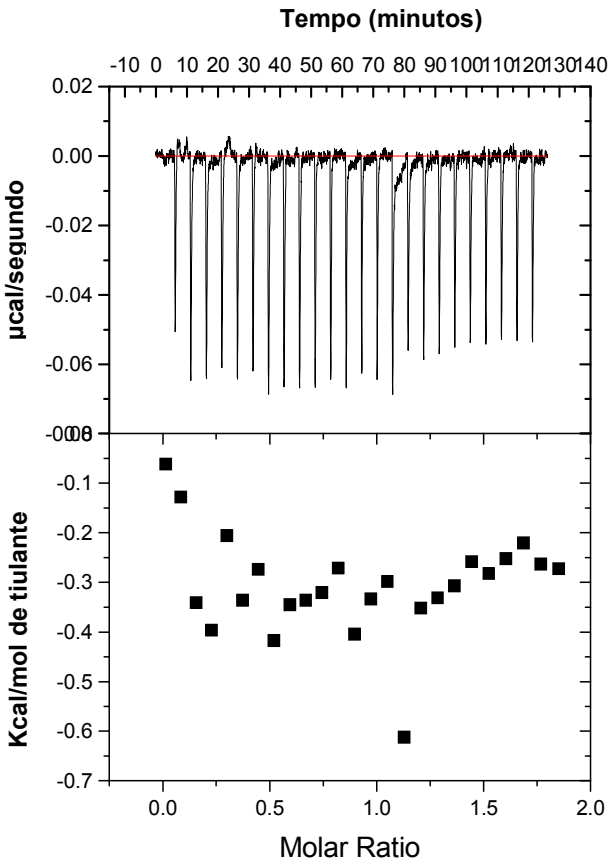


FIGURA 22 – TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* COM 2-OG. A titulação de GlnK com 2-OG foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína no experimento foi de 100 µmol/L e o titulante foi preprado a 3 mmol/L. A razão molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação.

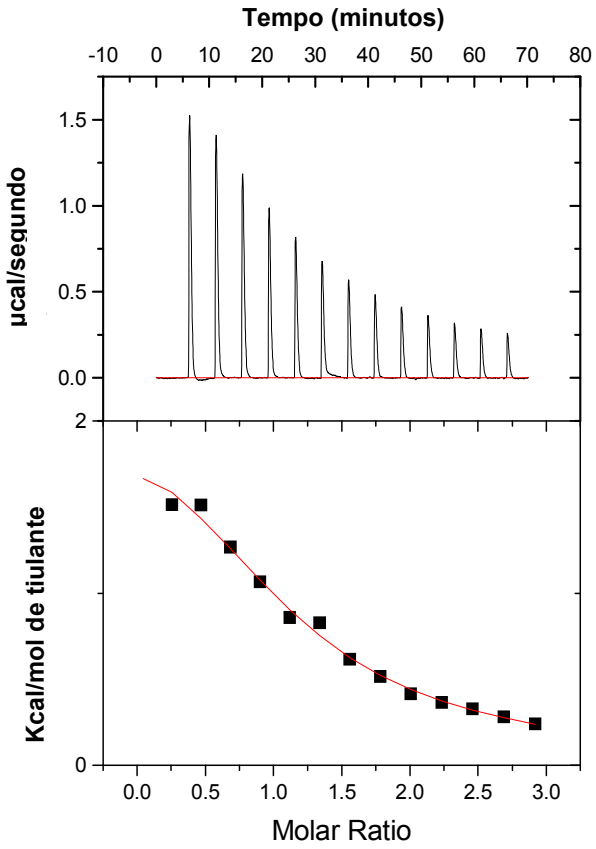


FIGURA 23 – TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* COM 2-OG NA PRESENÇA DE ATP. A titulação de GlnK na presença de 2 mmol/L de ATP foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal). O ATP foi adicionado à solução proteíca no momento do uso. Os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína no experimento foi de 100 µmol/L e o titulante foi preprado a 3 mmol/L. A razão molar (*Molar Ratio*) refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. O *fitting* da curva sigmóide foi feito considerando que a proteína tem 3 sítios de ligação seqüenciais.

O gráfico gerado pela titulação da proteína GlnK de *H. seropedicae* com ATP está mostrado na figura 20. Os dados permitiram calcular as constantes de dissociação de cada um dos sítios de ligação de ATP. Os resultados obtidos foram: K_{d1}=3,45 µmol/L, K_{d2}=60,06 µmol/L e K_{d3}=164,63 µmol/L. Esse efeito de cooperatividade negativa encontrada para a ligação do ATP é semelhante ao encontrado anteriormente para a proteína GlnB de *E. coli* (Jiang & Ninfa, 2007). Ainda é importante realizar a mesma titulação na presença de 2-OG para que possa ser feita uma previsão mais racional da ocupação dos sítios da proteína GlnK de *H. seropedicae in vivo*. Experimentos de ITC com a proteína GlnB de *Arabidopsis thaliana* demonstraram que a afinidade dessa proteína por ATP aumenta cerca de 4,5 vezes na ausência de 2-OG (Smith *et al*, 2003). Nesse caso foi encontrado apenas um K_d para o ATP, que foi de 13,7 µmol/L na ausência de 2-OG e 3 na presença 1mmol/L de 2-OG. Em *E. coli*, a afinidade de GlnK por ATP foi cerca de 11 vezes maior na presença de alto 2-OG quando comparado com baixo 2-OG (Radchenko *et al*, 2010).

O gráfico gerado da titulação de GlnK de *H. seropedicae* com ADP está mostrado na figura 21. Com ele, foi possível observar que a proteína possui três sítios seqüenciais também para a ligação de ADP. Assim como ocorre com a ligação de ATP, a ligação de uma molécula de ADP à proteína exerce uma cooperatividade negativa na ligação da próxima, o mesmo acontecendo da segunda para terceira. As constantes de dissociação de ADP para o proteína GlnK foram: K_{d1}=1,82 µmol/L, K_{d2}=26,31 µmol/L e K_{d3}=669,34 µmol/L. Esses resultados indicam que na ausência de 2-OG a afinidade dos dois primeiros sítios da proteína GlnK parece ser maior para ADP do que para ATP. No entanto é possível que exista alguma diferença dessas constantes de afinidade na presença de 2-OG. Em *A. thaliana* a ligação de 2-OG à proteína GlnB diminuiu a afinidade da proteína por ADP, já que o K_d na ausência de 2-OG foi igual a 69,9 µmol/L e na presença de 2-OG de 251,2 µmol/L (Smith *et al*, 2003).

O gráfico da titulação isotérmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* com 2-OG na ausência de ATP ou ADP mostrou que nessas condições não existe ligação (Figura 22). O mesmo resultado foi encontrado para proteínas PII de *E. coli* e *A. thaliana* (Kamberov *et al*, 1995). No entanto, quando a proteína GlnK foi titulada com 2-OG na presença de 2 mmol/L de ATP foi possível observar ligação (Figura 23). Diferente do que foi observado para a ligação de ADP e

ATP, a ligação de 2-OG foi endotérmica. A curva de titulação permitiu calcular cada uma das constantes de dissociação: K_{d1} = 27,57 µM, K_{d2}=512,82 µM e K_{d3}=286,04 µmol/L. Em *E. coli* foram encontradas as seguintes constantes de ligação de 2-OG em GlnB na presença de ATP (4 mmol/L): K_{d1} = 12 µmol/L, K_{d2}=120 µmol/L e K_{d3}=5000 µmol/L (Jiang & Ninfa, 2007). Em *A. thaliana* na presença de ATP foi encontrada apenas uma constante para 2-OG, que foi igual a 106,8 µmol/L (Smith *et al*, 2003). A ligação de 2-OG à proteína GlnK de *Bacillus subtilis* não é cooperativa e independe da presença de ATP (Heinrich *et al*, 2006). Já a proteína GlnK2 de *Archaeoglobus fulgidus* foi incapaz de ligar 2-OG em mesmo na presença ou ausência de ATP ou ADP (Helfmann *et al*, 2010).

Em *E. coli*, a concentração intracelular de 2-OG varia de 0,1 a 0,9 mmol/L (Senior, 1975). Considerando que em *H. seropedicae* essa concentração seja parecida, em baixas concentrações de 2-OG nenhum sítio de ligação de 2-OG nessa proteína estaria ocupado. No entanto, em altas concentrações de 2-OG os três sítios estariam ocupados, diferente do que acontece com GlnB de *E. coli*, na qual o terceiro sítio aparentemente nunca é ocupado (Jiang e Ninfa, 2007). De acordo com o resultado para a GlnK de *H. seropedicae*, o terceiro sítio tem um aumento na afinidade, permitindo que os três sítios estejam ocupados em alta concentração de 2-OG.

Ainda não foi realizado um ensaio de titulação de 2-OG com a proteína GlnK na presença de ADP, no entanto o dado de CD mostrado na figura 19 sugere fortemente que 2-OG é capaz também de se ligar à proteína na presença de ADP. Os ensaios de ITC nessas condições, bem como outras combinações ainda serão realizados.

Os resultados obtidos indicam que a proteína GlnK de *H. seropedicae* liga ATP, ADP e 2-OG, sendo que a ligação de 2-OG é dependente da ligação inicial de nucleotídeos fosfatados. A Tabela 3 mostra um resumo dos dados encontrados nos experimentos de ITC (constantes de dissociação, variações de entalpia e variações de entropia).

Tabela 3 – Parâmetros termodinâmicos da ligação de ATP, ADP e 2-OG na proteína GlnK de *H. seropedicae*

Titulação / Parâmetros	ATP em GlnK	ADP em GlnK	2-OG em GlnK:ATP
K_d1 (µmol/L)	3,45	1,82	27,57
ΔH1 (cal/mol)	-3892	-5370	2139
ΔS1 (cal/mol/K)	11,71	7,941	28,16
K_d2 (µmol/L)	60,06	26,31	512,82
ΔH2 (cal/mol)	-2703	-2580	1724
ΔS2 (cal/mol/K)	10,09	12,19	20,93
K_d3 (µmol/L)	164,63	669,34	286,04
ΔH3 (cal/mol)	-1241	-3301	1719
ΔS3 (cal/mol/K)	13,08	3,262	10,35

6. Conclusões

- O motivo conservado de cisteínas da proteína NifA de *H. seropedicae* não está relacionado com a ligação da proteína a região promotora do gene *nifB*;

- A proteína quimérica NifAQ2 (*Av*GAF e *Hs*AAA+ e *Hs*C-terminal), é sensível ao oxigênio, enquanto que a NifAQ1 (*HsGAF* e *Av*AAA+ e *AVC*-terminal) é insensível ao oxigênio, mostrando que o domínio GAF não é sensível às concentrações de oxigênio;

- O domíno GAF da proteína NifA de *H. seropedicae* interage fisicamente com as formas não modificada e uridiliada da proteína GlnK, sendo que o complexo GAF/GlnK não responde a ATP, ADP ou 2-OG, enquanto que o complexo GAF/GlnK-UMP_3 tem sua afinidade aumentada em altas concentrações de 2-OG. Portanto, uma diminuição na concentração de nitrogênio fixado, aumenta a afinidade do complexo GAF/GlnK-UMP_3.

- A interação *in vitro* do domínio GAF da proteína NifA com a proteína GlnK de *H. seropedicae* não modificada é mais estável do que com a proteína GlnK uridililada;

- A ligação de ATP à proteína GlnK de *H. seropedicae* causa modificação na estrutura secundária da proteína;

- A presença de ATP, ADP ou 2-OG não provocam mudança significativa na estabilidade térmica da proteína GlnK de *H. seropedicae*. No entanto, combinações de ATP+2-OG e ADP+2-OG causam um aumento de cerca de 2°C no Tm da proteína, indicando que existe ligação dessas moléculas na proteína;

- ATP, ADP e 2-OG são capazes de se ligar à proteína GlnK de *H. seropedicae*, no entanto 2-OG necessita de ATP ou ADP para a ligação;

- A proteína GlnK de *H. seropedicae* tem 3 sítios de ligação seqüenciais para ligação do ATP, com as seguintes constantes de dissociação: K_{d1}=3,45 µmol/L, K_{d2}=60,06 µmol/L e K_{d3}=164,63 µmol/L;

- A proteína GlnK de *H. seropedicae* tem 3 sítios de ligação seqüenciais para ligação do ADP, com as seguintes constantes de dissociação: K_{d1}=1,82 µmol/L, K_{d2}=26,31 µmol/L e K_{d3}=669,34 µmol/L;

- A proteína GlnK de *H. seropedicae* tem 3 sítios de ligação seqüenciais para ligação de 2-OG na presença de ATP, com as seguintes constantes de dissociação: K_{d1}=27,57 µmol/L, K_{d2}=512,82 µmol/L e K_{d3}=286,04 µmol/L;

7. Referências Bibliográficas

ADLER, S.P.; PURICH, D.; STADTMAN, E.R. Cascade Control of the *Escherichia coli* Glutamine Synthetase.**J. Biol. Chem.,** v. 250, p. 6264-6272, 1975.

ARAUJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.,** v. 155, p. 491-495, 2004.

ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control.**Microbiol.Mol. Biol. Rev.,** v. 65, p. 80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA Activity by PII in *Azospirillum brasilense*: Evidence by a Regulatory Role of the NifA N-terminal Domain. **J. Bacteriol.,** v. 178, p. 4830-4838, 1996.

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

AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and In Vitro Activities of the Nitrogen Fixation Control Proteins NifA and NifL.**J. Bacteriol.,** v. 176, p. 3460-3465, 1994.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J.A fourth *Azospirillum* species from cereal roots.**An. Acad. Bras. Cienc.,** v. 56, p.365, 1984.

BALI, A.; BLANCO, G.; HILL, S.; KENNEDY, C. Excretion of Ammonium by a *nifL* Mutant of *Azotobacter vinelandii* Fixing Nitrogen.**Appl. Environ. Microbiol.,**v. 58, p. 1711-1718, 1992.

BÁSTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibeberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.**v. 24, p. 7-11, 1998.

BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Evidence for Two Possible *glnB*-Type Genes in *Herbaspirillum serpopedicae*. **J. Bacteriol.,**v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK,M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol**.v.47, p. 309-314, 2001.

BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H.; KUSTU, S.In Vitro Studies of the Domains of the Nitrogen Fixation Regulatory NifA Protein. **J. Bacteriol.,** v. 177, p. 191-199, 1995.

BONDAREKO, V.; LIU, Y.; NINFA, A.; STUDITSKY, M. Action of prokaryotic enhancer over a distance does not require continued presence of promoter-bound σ^{54} subunit. **Nucl.Acids Res.**, v. 30, p. 636-642, 2002.

BORDES, P.; WIGNESHWARARAJ, S.R.; CHANEY, M.; DAGO, A.E.; MORETT, E.; BUCK, M. Communication between Eσ^{54}, promoter DNA and the conserved threonine residue in the GAFTGA motif of the PspF σ^{54}-dependent activator during transcription activation. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 489-506, 2004.

BONATTO, A.C., COUTO,H., SOUZA, E.M., ARAÚJO, L.M., PEDROSA, F.O., NOINDORF, L., BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*.**Protein Expr. Purif**. v. 55, n.2, p.293-29, 2007.

BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding.**Anal.Biochem.,** Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCK, M.; GALLEGOS, M.; STUDHOLME, D.J.; GUO, Y.; GRALLA, J.D.The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^{N}) Transcription Factor. **J. Bacteriol.,** v. 182, p. 4129-4136, 2000.

BUCK, M.; BOSE, D.; BURROWS, P.; CANNON, W.; JOLY.N.; PAPE, T.; RAPPAS, M.; SCHUMACHER, J.; WIGNESHWERARAJ, S.; ZHANG, X.A second paradigm for gene activation in bacteria. **Biochem.Soc.**, v. 34, p. 1067-1071, 2006.

BULEN, W.A.; LECOMTE, J.R. The Nitrogenase System of *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N_2 reduction, ATP-dependent H_2 evolution and ATP-hidrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 56, p. 979-986, 1966.

BURGESS, B.K.; LOWE, D.J. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase.**Chem. Rev.,** v. 96, p. 2983-3011, 1996.

CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Chromosomal integration of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in *E. coli*.**J. Gen. Microbiol.,** v. 80, p. 227-239, 1974.

CANNON, W.V.; KREUTZER, R.; KENT. H.M.; MORETT, E.; BUCK, M. Activation of the *Klebsiella pneumoniaenifU* promoter: identification of multiple and overlapping upstream NifA binding sites. **Nucl.Acids Res.**, v. 18, p. 1693-1701, 1990.

CARMONA, M.; MAGASANIK, B. Activation of Transcription at σ^{54}-dependent Promoters on Linear Templates Requires Intrinsic or Induced Bending of the DNA.**J. Mol. Biol.,** v. 261, p. 348-356, 1996.

CARMONA, M.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. DNA bending and the initiation of transcription at σ^{54}-dependent bacterial promoters.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 94, p. 9568-9572, 1997.

CHANEY, M.; GRANDE, R.; WIGNESHWERARAJ, S.R.; CANNON, W.; CASAZ, P.; GALLEGOS, M.; SCHUMACHER, J.; JONES, S.; ELDERNKIN, S.; DAGO, A.E.; MORETT, E.; BUCK, M. Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. **Genes Dev.,** v. 15, p. 2282-2294, 2001.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr→Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Gen. Genomics,** v. 273, p. 415-422, 2005.

COLNAGHI, R.; RUDNICK, P.; HE, L.; GREEN, A.; YAN, D.; LARSON, E.; KENNEDY, C. Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is supressible by prevention of glutamine syntethase adenylylation. **Microbiology,** v. 147, p. 1267-1276, 2001.

CONROY, M.J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X.D.; BULLOUGH, P.A.; WINKLER, F.K.; MERRICK, M. The crystal structure of the Escherichia coli AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 1213-1218, 2007.

CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, A.; BUSH, G.; KENNEDY, C; MERRICK, M. The Product of Nitrogen Fixation Regulatory Gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* Is Functionally and Structurally Homologus to the Uridylyltransferase Encoded by *glnD* in Enteric Bacteria. **J. Bacteriol.,** v. 173, p. 7741-7749, 1991.

CORBETT, M.C.; HU, Y.; NADERI, F.; RIBBE, M.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. Comparison of Iron-Molybdenum Cofactor-deficient Nitrogenase MoFe proteins by X-ray Absorption Spectroscopy. **J. Biol. Chem.,** v. 279, p. 28276-28282, 2004.

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

CRISTIANSEN, J.; DEAN, D.R.; SEEFELDT.Mechanistic Features of the Mo-Containing Nitrogenase. **Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 269-295, 2001.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER,A.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.)Merril). **Appl. Environ. Microbiol.,** v.67. p. 2375 – 2379, 2001.

DE CARLO, S.; CHEN, B.; HOOVER, T.R.; KONDRASHKINA, E.; NOGALES, E.; NIXON, T. The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. **Genes Dev.,** v. 20, p. 1485-1495, 2006.

DIXON, R. The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase syntesis in γ-Proteobacteria. **Arch. Microbiol.,** v. 169, p. 371-380, 1998.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation.**Nat. Rev. Microbiol.,** v. 2, p. 621-631, 2004.

DREPPER, T.; GROSS, S.; YAKUNIN, A.F.; HALLENBECK, P.C.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203-2212, 2003.

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

DURAND, A.; MERRICK, M. *In vitro* analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. **J. Biol. Chem.,** v. 281; p. 29558-67, 2006.

EYDMANN, T.; SODERBACK, E.; JONES, T.; HILL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. Transcriptional Activation of the Nitrogenase promoter In Vitro: Adenosine Nucleotides Are Required for Inhibition of NIFA Activity by NIFL. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 1186-1195, 1995.

FENTON, M.S.; LEE, S.J.; GRALLA, J.D. *Escherichia coli* promoter opening and –10 recognition: mutational analysis of σ^{70}. **EMBO J.,** 19, p. 1130-1137, 2000.

FISCHER, H.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradirhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H.; FRITSCHE, S.; HERZOG, B.; HENNECK, H. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradirhizobium japonicum* NifA protein. **FEBS Lett.,** v. 225, p. 167-171, 1989.

FISCHER, H. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol.Rev.**, v. 58, p. 152-386, 1994.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU de MARSAC, N. The PII protein in the cyanobacterium*Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N status. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 84–91, 1994.

GALLEGOS, M.T.; CANNON, W.V.; BUCK, M. Functions of the σ^{54} Region I *in Trans* and Implications for Transcription Activation. **J. Biol. Chem.,** v. 274, p. 25285-25290, 1999.

GRABBE, R; KLOPPROGGE, K.; SCHMITZ, R.A. Fnr Is Required for NifI-Dependent Oxygen Control of *nif* Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae*.**J. Bacteriol.,** v. 183, p. 1385-1393, 2001.

GRABBE, R.; SCHMITZ, R.A. Oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends of NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. **Eur. J. Biochem.,** v. 270, p. 1555-1566, 2003.

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL, 3rd; STROUD, R.M.; Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 42-47, 2007.

GUO, Y.; GRALLA, J.D. Promoter opening via a DNA fork junction binding activity.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 95, p. 11655-11660, 1998.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytol.,**v. 154, p. 131-145, 2002.

HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 75, p. 2699-2702, 1978.

HANSON, P.I.; WHITEHEART, S.W. AAA+ Proteins: Have Engine, Will Work. **Mol. Cel. Bio.**, v. 6, p. 519-529, 2005.

HEINRICH, A.; WOYDA, K.; BRAUBURGER, K.; MEISS, G.; DETSCH, C.; STÜLKE, J.; FORCHHAMMER, K. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 34909-17, 2006.

HELFMANN S, LÜ W, LITZ C, ANDRADE SL. Cooperative binding of MgATP and MgADP in the trimeric P(II) protein GlnK2 from *Archaeoglobus fulgidus*. **J. Mol. Biol.**, v. 402, p. 165-177, 2010.

HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 235-254, 1994.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological Role for the GlnK Protein of Enteric Bacteria: Relief of NifL Inhibition under Nitrogen-Limiting conditions. **J. Bacteriol.,** v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HELLING, L.B. Why Does *Escherichia coli* Have TwoPrimary Pathways for Synthesis of Glutamate? **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 4664-4668, 1994.

HELLING, L.B. Pathway Choice in Glutamate Synthesis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.,** v. 180, p. 4571-4575, 1998.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelanii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; ARAUJO, M.S.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B.R; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Mol. Microbiol.,** v, 59, p. 326-337, 2006.

HUERGO, L.F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; ARAUJO, L.M.; SOUZA, E.M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1523-1525, 2007.

HUERGO LF, MERRICK M, MONTEIRO RA, CHUBATSU LS, STEFFENS MB, PEDROSA FO, SOUZA EM. *In vitro* interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 6674-82, 2009.

HUERGO, L.F.; NOINDORF, L.; GIMENES, C.; LEMGRUBER, R.S.P.,;CORDELINI, D.F.; FALARZ, J.; CRUZ, L.M.; MONTEIRO, R.A.; PEDORA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, 308, 40-47, 2010.

HIRSCHMAN, J.; WONG, P.; SEI, K.; KEENER, J.; KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription *in vitro*: Evidence that the *ntrA* product is a σ factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 82, p. 7525-7529, 1985.

HUALA, E.; AUSUBEL, F.M. The Central Domain of the *Rhizobium meliloti* NifA Is Sufficient To Activate Transcription from the *R. melilotinifH* promoter. **J. Bacteriol.,** v. 171, p. 3354-3365, 1989.

HUALA, E.; STIGTER, J.; AUSUBEL, F.M. The Central Domain of the *Rhizobium leguminosarum* DctD functions Independently To Activate Transcription. **J. Bacteriol.,** v. 174, p. 1428-1431, 1992.

HUNT, T.P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by a purified *Escherichia coli* components: Core RNA polymerase and the products *glnF, glnG* and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 82, p. 8453-8457, 1985.

JACK, R.; ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The Signal Transduction Protein GlnK Is Required for NifL-dependent Nitrogen Control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.,** v. 181, p. 1156-1162, 1999.

JANG, S.B.; SEEFELDET, L.C.; PETERS, J.W. Modulating the Midpoint Potential of the [4Fe-4S] Cluster of the Nitrogenase Fe Protein. **Biochemistry,** v. 39, p. 641-648, 2000.

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, p. 12782-94, 1998.

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, p. 12979-96, 2007.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*.**J. Biol. Chem,** v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JAYAKUMAR, A.; HWANG, S.J.; FABINY, J.M.; CHINAULT, A.G.; BARNES, E.M. Isolation of an Ammonium or Methylammonium Ion Transport Mutant of *Escherichia coli* and the Complementation by the Cloned Gene. **J. Bacteriol.,** v. 171, p. 996-1001, 1989.

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

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA.A. J. Enzimological characterization of the signaltransducing uridyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli*.Biochemistry. v. 37, p. 12782-12794, 1998.

KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. The *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Is Activated upon Binding 2-Ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.,** v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHMITZ, R.A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.,** v. 177, p. 223-234, 2002.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-Dependent Genes Is Probably United by a Common Mechanism. **Microbiol.Rev.,** v. 53.p. 367-376, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, H.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. In Vitro Activity of NifL, a Signal Transdutcion Protein for Biological Nitrogen Fixation. **J. Bacteriol.,** v. 175, p. 7683-7688, 1993.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct Interection of the NifL Regulatory Protein with the GlnK Signal Transduction Enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA Regulatory System to Respond to Conditions Replet for Nitrogen. **J. Biol. Chem.,** v. 277, p. 15472-15481, 2002.

LONETTO, M.; GRIBSKOV, M.; GROSS, C.A. The σ^{70} Family: Sequence Conservation and Evolutionary Relationships. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 3843-3849, 1992.

LUPAS, A.N.; MARTIN, J. AAA proteins. **Curr.Opin.Struct.Biol.,** v. 12, p. 746-753, 2002.

MACHEROUX, P.; HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; KIM, S.; POOLE, R.; DIXON, R. Electron donate to the flavoprotein NifL, a redox sensing transcriptional regulator. **Biochem.J.,** v. 332, p. 413-419, 1998.

MARINI, A.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. Cloning and expression of the *MEP*1 gene encoding an ammonium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.,** v. 13, p. 3456-3463, 1994.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. **J. Bacteriol.,** v. 186, p. 601-610, 2004a.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL.**Mol. Microbiol.,** v. 52, p. 1731-1744, 2004b.

MAYER, S.M; LAWSON, D.M.; GORMAL, C.A.; ROE, S.M; SMITH, B.E. New Insights into Structure-function Relationships in Nitrogenase: A 1,6 Å Resolution X-ray Crystallographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe protein. **J. Mol. Biol,** v. 292, p. 871-891, 1999.

MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; TYLER, B. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 150, 1302-1313, 1982.

MELETZUS, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* Operon of *Azotobacter vinelandii..* **J. Bacteriol.,** v. 180, p. 3260-3264, 1998.

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*.**Mol. Gen. Genet.,** v. 185, p. 75-81, 1982.

MERRICK, M.J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Simbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRRIS, R. H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, 1992. p. 835-876, 1992.

MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The Helix-Turn-Helix Motif of σ^{54} Is Involved In Recognition of the –13 promoter region. **J. Bacteriol.,** v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria.**Microbiol.Reviews,** v. 59, p. 604-622, 1995.

MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK Proteins Control Nitrogen Fixation and Ammonia Assimilation.**J. Bacteriol.,** v. 181, p. 2655-2658, 1999.

MILENKOV, M.; THUMMER, R.; GLÖER, J.; GRÖTZINGER, J.; JUNG, S.; SCHMITZ, R.A. Insights into membrane association of Klebsiella pneumoniae NifL under nitrogen fixing conditions by mutational analysis. **J. bacteriol.,** 2010.

MILLER, J.H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria.** New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992.

MONEY, T.; JONES, T.; DIXON, R.; AUSTIN, S. Isolation and Properties of the Complex betweenthe Enhancer Binding Protein NIFA and the Sensor NIFL.**J. Bacteriol.,** v. 181, p. 4461-4468, 1999.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.,**v. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. In-*trans* regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Heraspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol.Lett.,**v. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.,**v. 508, p. 1-4, 2001.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.,**v. 69, p. 1527-1531, 2003a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression, purification and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expr.Purif.**v. 27, p. 313-318, 2003b.

MONTESINOS, M.L.; MURO-PASTOR, A.M.; HERRERO, A.; FLORES, E. Ammonium/Methylammonium Permeases of a Cianobacterium.**J. Biol. Chem.** v. 273, p. 31463-31470, 1998.

MORETT, E; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequence of the *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Res.,** v. 16, p. 11469-1488, 1988.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 85, p. 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} Bacterial Enhancer Binding-Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. **J. Bacteriol.,** v. 175, p. 6067-6074, 1993.

MORRET, E., FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. **J. Bacteriol.,** v. 173, p. 3478–3487, 1991.

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of Gluconacetobacter diazotrophicus and Herbaspirillum sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiol. Res.**, v. 161, p. 238-245, 2006.

NINFA, A.J.; MAGASANIK, B.Covalent modification of the *glnG* product, NR_I, by the *glnL* product, NR_{II}, regulates the transcription of the *glnALG* operon of the *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 83, p. 5909-5913, 1986.

NINFA, A.J.; ATKINSON, M.R. PII signal transduction proteins.**Trends Microbiol.,**v. 8, p. 172-179, 2000.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J.; FROMMER, W.B. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter for plants. **EMBO J.,** v. 13.p. 3464-3471, 1994.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.M; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnkamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.,** v. 185 (1), p. 55-62, 2005.

NOINDORF, L. **Idendificação e caracterização do operon *orf1glnKamtB* e do gene *amtH* de *Herbaspirillum seropedicae*.** Curitiba, 2006. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVARES, F. L.; JAMS, E.K.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugarcane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **New Phytol.,**v. 135, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, M.A.S; BAURA, V.A.; AQUINO, B.; HUERGO, L.F.; KADOWAKI, M.A.S; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; DIXON, R.; PEDROSA, F.O.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R.A. Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Res. Microbiol.**, v. 160, p. 389-395, 2009.

PAGET, M.S.B.; HELMANN, J.D.The σ^{70} family of sigma factors.**Genome Biol.,** v. 4, p.203, 2003.

PASCHEN, A.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* genes expression in the presence of ammonium.**FEMS Microbiol.Lett.**, v. 200, p. 207-213, 2001.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROSS, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 5240-5247, 2003.

PIERCE, M.M.; RAMAN, C.S; NALL, B.T. Isotermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. **Methods,** v. 19, p. 213-221, 1999.

RADCHENKO MV, THORNTON J, MERRICK M. Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 31037-45, 2010.

RAPPAS, M. SCHUMACHER, J.; BEURON, F.; NIWA, H.; BORDES, P.; WIGNESHWARARAJ, S.; KEETCH, C.A.; ROBINSON, C.V.; BUCK, M.; ZHANG, X. Structural Insights into the Activity of Enhancer-Binding Proteins. **Science,** v. 307, p. 1972-1975, 2005.

RAPPAS, M.; SCHUMACHER, J.; NIWA, H.; BUCK, M.; ZHANG, X. Structural Basis of the Nucleotide Driven Conformational Changes in the AAA+ Domain of Transcriptional Activator PspF. **J. Mol. Biol.**, v. 357, p. 481-492, 2006a.

RAPPAS, M.; BOSE, D.; ZHANG, X. Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54}-dependent gene transcription. **Curr.Opin.Struct.Opin.,** v. 17, p. 1-7, 2006b.

REITZZER, L; SCHNEIDER, B.L. Metabolic context and possible physiological themes of sigma 54 – dependent genes in *Escherichia coli.*Microbiol.Mol. Biol. Rev. v. 63, p. 422-444, 2001.

REITZER, L. Nitrrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*.**Annu.Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-176, 2003.

REYES-RAMIREZ F, LITTLE R, DIXON R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J. Bacteriol.** v. 183, n. 10, p. 3076-3082, 2001.

ROSELIN, L. S.; LIN, M.; LIN, P.; CHANG, Y.; CHEN, W. Recent trends and some applications of istothermal titration calorimetry in biotechnology. **Biotechnol.**, v. 5, p. 85-98, 2010.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUANATILAKA, M.K.; HINES, E.R.; KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-Mediated Regulation of NifA Activity in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.,** v. 184, p. 812-820, 2002.

RYLE, M.J.; LANZILOTTA, W.N.; SEEFELDT, L.C; SCARROW, R.C.; JENSEN, G.M. Circular Dichroism and X-ray Spectroscopies of *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Iron Protein. **J. Biol. Chem,** v. 271, p. 1551-1557, 1996.

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

SASSE-DWIGHT, S.; GRALLA, J.D. Probing the *Escherichia coliglnALG* upstream activation mechanism *in vivo*.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 85, p. 8934-8938, 1988.

SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHLESSMAN, J.M.; WOO, D.; JOSHUA-TOR, L.; HOWARD, J.B.; REES, D.C. Conformational Variability in Structures of the Nitrogenase Iron Proteins from *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. **J. Mol. Biol,** v. 280, p. 669-685, 1998.

SCHUMACHER, J.; ZHANG, X.; JONES, S.; BORDES, P.; BUCK, M. ATP-dependent Transcriptional Activation by Bacterial PspF AAA+ Protein.**J. Mol. Biol.,** v. 338, p. 861-875, 2004.

SCHMITZ, R.A. NifL of *Klebsiella pneumoniae* carries a N-terminally bound FAD cofactor, wich is not directly required for the inhibitory function of NifL. **FEMS Microbiol.Lett.,**v. 157, p. 313-318, 1997.

SCOTT, D.J.; FERGUSON, A.L.; GALLEGOS, M.; PITT, M.; BUCK, M.; HOGGETT, J.G. Interaction of sigma factor σ^N with *Escherichia coli* RNA polymerase core enzyme.**Biochem.J.,** v. 352, p. 539-547, 2000.

SCREEN, S.; WATSON, J.; DIXON, R. Oxygen sensitivity and metal ion-dependent transcriptional activation by NIFA protein from *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii.* **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 313-22, 1994.

SEEFELDT, L.C.; HOFFMAN, B.M.; DEAN D,R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 18, p. 701-722, 2009.

SENIOR, P.J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella* aerogenes: studies with the continuous culture technique. **J. Bacteriol**. v. 123, p.407-410, 1975.

SHAH, V.K.; BRILL, W.J.; Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 74, p. 3249-3253, 1977.

SIEWE, R.M.; WEIL, B.; BURKOVSKI, A.; EIKMANNS, B.J.; EIKMANNS, M.; KRAMER, R. Functional and Genetic Characterization of the (Methyl)ammonium Uptake Carrier of *Corynebacterium glutamicum*. **J. Biol. Chem,** v. 271, p. 5398-5403, 1996.

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

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

SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammmonium transport B (AmtB) protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 95, p. 7030-7034, 1998.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.,** v. 137, p. 1511-1522, 1991a.

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

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

STIPS, J; THUMMER, R.; NEUMANN, M.; SCHMITZ, R.A. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*.**Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 3379-3388, 2004.

STUDHOLME, D.J.; DIXON, R. Domain Architectures of σ^{54}-Dependent Transcriptional Activators.**J. Bacteriol.,** v. 185, p. 1757-1767, 2003.

SU, W.; PORTER, S.; KUSTU, S.; ECHOLS, H. DNA-looping and enhancer activity: Association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 87, p. 5504-5508, 1990.

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 82, p. 1074-1078, 1985.

TAYLOR, B.L; ZHULIN, I.B. PAS domains: internal sensor of oxygen, redox potential, and light. **Microbiol.Mol. Biol. Rev.,** v. 63, p. 479-506, 1999.

THOMAS, G.H.; MULLINS, J.G.L; MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters.**Mol. Microbiol.,** v. 37, p. 331-334, 2000a.

THOMAS, G.H.; COUTTS G.; MERRICK, M.The *glnKamtB* operon.**Trends.Genet.**, v. 16, p. 11-14, 2000b.

TULI, R.; MERRRICK, M.J. Over-production and characterisation of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae*-the transcription activator of *nif* gene expression.**J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 425-432, 1988.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., VANDERLEYDEN, J., DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium Azospirillum brasilense. **J. Bacteriol**. v. 180, n.10, p.2652-2659,1998.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilenseglnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, p. 813-820, 2002.

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regularion of

glutamine synthetase in *Eschericia coli.* **Mol. Microbiol.** v. 21, p. 133-146, 1996.

WANG, L.; GRALLA, J.D. Multiple In Vivo Roles of the –12-Region Elements of Sigma 54 Promoters. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5626-5631, 1998.

WANG, H.; FRANKE, C.C.; NORDLUND, S.; NORÉN, A. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. **FEMS Microbiol.Lett.,** v. 253, p. 273-279, 2005.

WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATTES, M.G.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.,** v. 35, p. 756-764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; YATTES, M.G.; REGO, F.G.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Control of autogenus activation of *Herbaspirillum seropedicaenifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol.Lett.,**v. 212, p. 177-182, 2002.

WOLFE, D.M.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G.P. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 6861-6869, 2007.

WOOTTON, J.C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory protein. **Protein Eng.,** v. 2, p. 535-543, 1989.

WOSTEN, M.M.S.M. Eubacterial sigma factors.**FEMS Microbiol.Rev.,** v. 22, p. 127-150, 1998.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 539-544, 2003.

ZHANG, X.; CHANEY, M.; WIGNESHWERARAJ, S.R.; SHUMACHER, J.; BORDES, P.; CANNON, W.; BUCK, M. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation.**Mol. Microbiol.,** v. 45, p. 895-903, 2002.

ZHANG, Y.; POLHMANN, E.L.; ROBERTS, G.P. Identification of a critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosyntetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 101, p. 2782-2787, 2004.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNECHE, S.; WINKLER, F.K.; LI, X. The mechanism of ammonia transport based in crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 101, p. 17090-17095, 2004.

ZHULIN, I.B.; TAYLOR, B.L.; DIXON, R. PAS domain S-boxes in Archea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. **Trends.Biochem.Sci.,** v. 22, p. 331-333, 1997.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo