

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO DOS ALVOS CELULARES DAS
PROTEÍNAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL PII DO
DIAZOTRÓFICO DE VIDA LIVRE *AZOSPIRILLUM*
*AMAZONENSE***

Débora Broch Trentini

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Dr^a. Irene Silveira Schrank

Porto Alegre, 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microrganismos Diazotróficos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelas entidades Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Irene Silveira Schrank, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim, mas principalmente pela liberdade para tomar decisões e buscar novas metodologias, que me fizeram continuar crescendo como cientista ao longo de todos esses anos.

Aos professores Augusto Schrank e Henrique Bunselmeyer Ferreira, membros da minha comissão de acompanhamento, pelas sugestões e críticas pertinentes.

Aos demais professores do PPGBCM, principalmente Arnaldo Zaha, Marilene Henning Vainstein, Augusto Schrank e Henrique Ferreira, por terem acompanhado de perto o desenvolvimento do meu mestrado. À professora Marilene Vainstein em especial pelas cartas de recomendação, que foram fundamentais para os meus caminhos futuros.

À professora Célia Maria de Almeida Soares e aos professores Marilene Vainstein e Augusto Schrank pela oportunidade de realizar o curso de Introdução à Proteômica na Universidade Federal de Goiás, que além de ajudar muito na conclusão dos experimentos despertou o meu interesse para essa área. Novamente à professora Célia Soares, pelo material do sistema de duplo híbrido em levedura, a aos alunos do seu grupo, pela hospitalidade e por prestarem assistência com o sistema de duplo híbrido e com o ProteinLynx.

À Dr^a Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos do Laboratório Nacional de Computação Científica, por disponibilizar os dados referentes ao sequenciamento genômico de *Azospirillum amazonense*.

À professora Leda Chubatsu, por disponibilizar o plasmídeo de expressão da GlnD de *A. brasilense*, e à Dr^a Luíza Maria de Araújo, pela proteína GlnB de *A. brasilense*, mas principalmente pela paciência e disposição em responder as minhas dúvidas sobre bioquímica de proteínas.

À equipe da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial ao Charley Christian Staats e Jeferson Segalin, sempre dispostos a ajudar e responder as minhas dúvidas.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial Sílvia, Luciano, Milton e Paulo.

Aos colegas dos laboratórios 210 e 206, pelos empréstimos de material e equipamentos.

Aos colegas dos laboratórios 220 e 217, em especial Juliana Crestani, minha companheira na proteômica, pela ajuda constante, Lívia, pela ajuda com as compras e pelo exemplo de organização e responsabilidade, Lucélia, pelo auxílio com a eletroforese bidimensional, e ainda Bianca, Luciana, Carolina, Juliano, Ângela, Lis, Juliana Beringer e Bárbara – pela ajuda e pelos momentos de descontração que tornaram esses anos muito mais fáceis.

Aos meus colegas de laboratório – Dieime, Fernando, Franciele, Luciano, Maicon, Ricardo e Shana. Não sei como agradecer pela amizade e pelo companheirismo de tanto tempo, que sempre foram muito além do laboratório e que vou levar para a minha vida. Também aos colegas antigos, novos e temporários – Beatriz, Karyne, Fernanda, Scheila, Tiago e Ângela Decian.

À minha família e aos meus amigos, por tudo.

ÍNDICE GERAL	
AGRADECIMENTOS	IV
ÍNDICE GERAL	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS E SIGLAS	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O elemento nitrogênio	1
1.2 O gênero <i>Azospirillum</i>	3
1.2.1 <i>Azospirillum amazonense</i>	4
1.3 Assimilação de nitrogênio em bactérias	5
1.3.1 A regulação da atividade da glutamina sintetase	6
1.3.2 Regulação transcricional do metabolismo de nitrogênio: o Sistema Ntr	7
1.4 As proteínas PII de transdução de sinal	10
1.4.1 Os efetores de PII: indicação da fisiologia celular	10
1.4.2 Estrutura de PII	12
1.4.3 Classificação das proteínas PII	13
1.4.4 GlnK: um segundo nível de regulação	14
1.4.5 A associação de GlnK com AmtB: um novo princípio regulatório	15
1.5 Regulação da fixação do nitrogênio	16
1.5.1 Regulação pós-traducional da nitrogenase	17
1.5.2 Regulação transcricional da fixação do nitrogênio: a proteína NifA	19
1.6 Alvos celulares de PII em diferentes organismos	21
1.7 O metabolismo de nitrogênio em <i>Azospirillum amazonense</i>	22
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Métodos básicos em biologia molecular	27
3.2 Clonagem e expressão heteróloga de GlnB de <i>A. amazonense</i>	27
3.3 Clonagem e expressão heteróloga de GlnK de <i>A. amazonense</i>	28

3.4	Extração das proteínas recombinantes	29
3.5	Purificação de GlnB por cromatografia de afinidade por níquel	29
3.6	Purificação de GlnK por cromatografia de afinidade por níquel	30
3.7	Preparo dos extratos proteicos de <i>A. amazonense</i> referentes a condições de abundância e privação de nitrogênio	31
3.8	Metodologia de <i>pull-down</i>	32
3.9	Preparo das amostras para LC-MS/MS	32
3.10	Identificação das proteínas por espectrometria de massas em tandem	33
3.11	Anotação de sequências	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	Expressão heteróloga e purificação de GlnB e GlnK recombinantes	35
4.2	<i>Pull-down</i> de GlnB e GlnK deuridiladas com extrato proteico de <i>A. amazonense</i> referente à condição de abundância de nitrogênio fixado.	41
4.3	<i>Pull-down</i> de GlnB e GlnK deuridiladas com extrato proteico de <i>A. amazonense</i> referente à condição de privação de nitrogênio fixado.	42
5.	DISCUSSÃO	56
5.1	Proteínas de interação de GlnB e GlnK de <i>A. amazonense</i>	56
5.1.1	Fatores transcricionais	61
5.1.2	Proteínas do metabolismo de metais	68
5.1.3	Enzimas metabólicas	71
5.1.4	Transportadores	75
5.1.5	Proteínas de função diversa	76
5.1.6	Proteínas de função desconhecida	79
5.1.7	Proteínas ribossômicas	80
5.2	Uma terceira proteína PII em <i>Azospirillum amazonense</i>	81
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	83
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8.	ANEXOS	102
8.1	Vetores de expressão pET-23(+)	102
8.2	Vetor de expressão pET-28a(+)	103
8.3	Protocolo: Digestão tríplica <i>in gel</i> de proteínas coradas com Coomassie	104
8.4	Curriculum Vitae	107

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

1.1 O ciclo redox do nitrogênio.	2
1.2 Atividades da via GS/GOGAT e de GDH.	6
1.3 Regulação da atividade da glutamina sintetase (GS) por PII.	7
1.4 Sistema regulatório geral do nitrogênio (Ntr).	9
1.5 Estrutura das proteínas PII.	12
1.6 Modelo do papel de PII na regulação das enzimas DraT e DraG em resposta a disponibilidade de nitrogênio em <i>A. brasilense</i> .	18
1.7 Alvos de proteínas tipo GlnB e GlnK em vários organismos.	22
1.8 Genes codificantes para proteínas PII em <i>A. amazonense</i> .	24

RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação de GlnB de <i>A. amazonense</i> .	36
4.2 Expressão de GlnK-6His em diferentes linhagens de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	37
4.3 Expressão de GlnK6His a partir de pET28a-GlnK6His (NcoI/XhoI).	38
4.4 Expressão de 6HisGlnK a partir de pET28a-6HisGlnK (NdeI/BamHI).	39
4.5 Purificação de 6HisGlnK por cromatografia de afinidade por níquel.	40
4.6 <i>Pull-down</i> da proteína GlnB deuridilada contra extrato proteico de <i>A. amazonense</i> cultivado em condições de abundância de nitrogênio.	44
4.7 <i>Pull-down</i> da proteína GlnK deuridilada contra extrato proteico de <i>A. amazonense</i> cultivado em condições de abundância de nitrogênio.	45
4.8 <i>Pull-down</i> da proteína GlnB deuridilada contra extrato proteico de <i>A. amazonense</i> submetido a ausência de nitrogênio fixado.	46
4.9 <i>Pull-down</i> da proteína GlnK deuridilada contra extrato proteico de <i>A. amazonense</i> submetido a ausência de nitrogênio fixado.	47

ANEXOS

8.1 Mapa do vetor de expressão pET-23a(+).	102
8.2 Região de clonagem/expressão de vetores da série pET-23.	102
8.3 Mapa do vetor de expressão pET-28a(+).	103
8.4 Região de clonagem/expressão de vetor pET-28a.	103

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 <i>Primers</i> utilizados neste estudo	34
---	----

RESULTADOS

4.1 Proteínas identificadas por <i>pull-down</i> utilizando a proteína GlnB deuridilada e extrato proteico de <i>A. amazonense</i> cultivado em condições de abundância de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.	48
--	----

4.2 Proteínas identificadas por <i>pull-down</i> utilizando a proteína GlnK deuridilada e extrato proteico de <i>A. amazonense</i> cultivado em condições de abundância de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.	49
--	----

4.3 Proteínas identificadas por <i>pull-down</i> utilizando a proteína GlnB deuridilada e extrato proteico de <i>A. amazonense</i> submetido a condições de falta de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.	51
--	----

4.4 Proteínas identificadas por <i>pull-down</i> utilizando a proteína GlnK deuridilada e extrato proteico de <i>A. amazonense</i> submetido a condições de falta de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.	53
--	----

DISCUSSÃO

5.1 Proteínas identificadas em mais de um experimento de <i>pull-down</i> .	59
--	----

5.2 Enzimas metabólicas encontradas nos experimentos de <i>pull-down</i> .	72
---	----

5.3 Proteínas de função desconhecida encontradas nos experimentos de <i>pull-down</i> .	80
--	----

ABREVIATURAS E SIGLAS

2OG	2-oxoglutarato
AAA+	<i>ATPases associated with a variety of cellular activities</i> ATPases associadas com uma variedade de atividades celulares
AmtB	<i>ammonium transporter</i> transportador de amônia
ATase	adenililtransferase
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDD	Conserved Domain Database
cDNA	DNA complementar
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DraG	<i>dinitrogenase reductase glycohydrolase</i> dinitrogenase redutase glicohidrolase ativadora
DraT	<i>dinitrogenase reductase ADP-ribosylation transferase</i> dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase
DTT	ditiotreitól
EBP	<i>enhancer binding proteins</i> proteínas ativadoras de transcrição
ECF	<i>extracytoplasmic function</i> função extracitoplasmática
ESI-QUAD-TOF	<i>electrospray ionization-quadrupole-time of flight</i> ionização por <i>electrospray</i> -quadrupolo-tempo de voo
EPS	exopolisacarídeos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBN	fixação biológica do nitrogênio
Fur	<i>ferric uptake regulator</i> regulador de captação de ferro

GAF	<i>cGMP-specific and stimulated phosphodiesterases, Anabaena adenylate cyclases and Escherichia coli FhlA</i>
GDH	glutamato desidrogenase
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GOGAT	glutamato sintase (ou glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase)
GS	glutamina sintetase
HC	histidina cinase
HHE	domínio Histidina-Histidina-Glutamato
HTH	<i>helix-turn-helix</i> hélice-volta-hélice
IHF	<i>integration host factor</i> fator de integração do hospedeiro
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography- mass spectrometry/mass spectrometry</i> cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
Mar	<i>multiple antibiotic resistance</i> resistência a múltiplos antibióticos
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase</i> transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney
N+	abundância de nitrogênio
N-	escassez de nitrogênio
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
<i>nif</i>	<i>nitrogen fixation</i> fixação de nitrogênio
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> níquel-ácido nitriloacético
NRPS	<i>nonribosomal peptide synthetase</i> sintetases de peptídeos não ribossômicos

Ntr	<i>nitrogen global regulation system</i> sistema regulatório geral do nitrogênio
pb	par de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> reação em cadeia da polimerase
PHA	polihidroxialcanoato
PHB	polihidroxibutirato
RNAP	RNA polimerase
RR	regulador de resposta
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i> PCR com transcrição reversa
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> sódio dodecil sulfato - eletroforese em gel de poliacrilamida
UAS	<i>upstream activation sequences</i> sequências de ativação a montante
UMP	uridila
UTase/UR	enzima uridil-transferase/uridil-removedora

RESUMO

A superfamília PII de proteínas de transdução de sinal é conhecida por conter as proteínas sinalizadoras mais amplamente distribuídas na natureza, sendo ubíquas entre bactérias. Elas desempenham um papel chave na coordenação da regulação de processos metabólicos centrais, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo de nitrogênio. As proteínas PII atuam por interação direta com uma variedade de alvos celulares, tais como fatores transcricionais, enzimas e transportadores, resultando na modulação da atividade desses receptores. A sinalização realizada por PII apresenta o potencial de responder a três sinais metabólicos: o sinal de energia ATP, o sinal de carbono 2-oxoglutarato e o sinal de nitrogênio glutamina. Os dois primeiros são transmitidos diretamente pela ligação das moléculas efetoras, enquanto que os níveis de nitrogênio são refletidos pela uridilação reversível de PII pela enzima GlnD, em condições de deficiência de nitrogênio.

Em microrganismos diazotróficos, o papel das proteínas PII é estendido para o controle do processo de fixação de nitrogênio. O gênero *Azospirillum* é composto de diazotróficos de vida livre capazes de se associar de forma benéfica com diversas gramíneas, como por exemplo, cana-de-açúcar e arroz. Com o objetivo de analisar os sistemas regulatórios do metabolismo e da fixação de nitrogênio no modelo de estudo *Azospirillum amazonense*, foi proposta uma investigação da função das proteínas PII nessas vias. Os alvos celulares dos parálogos de PII presentes em *A. amazonense* – chamados de GlnB e GlnK – foram investigados utilizando experimentos de *pull-down*. Dois extratos de *A. amazonense* foram testados, referindo-se a condições de crescimento em abundância e limitação de nitrogênio. Ao todo, 42 prováveis proteínas de interação das formas não modificadas das duas proteínas PII foram identificadas por espectrometria de massas em tandem, no entanto as interações mapeadas devem ser confirmadas por métodos alternativos. Entre as proteínas isoladas, destaca-se a presença de 10 fatores transcricionais. Esses podem representar pontos de conexão com outros sistemas regulatórios, tais como o sistema de controle do conteúdo celular de exopolissacarídeos e o sistema de controle redox de processos energéticos. Além desses reguladores, nossos resultados incluem 2 proteínas envolvidas no metabolismo de metais, 2 transportadores, 12 enzimas metabólicas, 7 proteínas de funções basais e 9 proteínas de função desconhecida.

ABSTRACT

The PII superfamily of signal transduction proteins is known to contain the most widely distributed signaling proteins in nature, being ubiquitous among bacteria. They play a major role in coordinating the regulation of central metabolic processes, especially those related to nitrogen metabolism. PII proteins act by direct interaction with a variety of cellular targets, such as transcription factors, enzymes and transporters, resulting in modulation of receptor activities. PII signaling has the potential to respond to three central metabolic signals: the energy signal ATP, the carbon signal 2-oxoglutarate and the nitrogen signal glutamine. The first two are sensed directly by the binding of the effector molecules. The nitrogen levels are reflected by reversible uridylation of the PII by the glutamine-sensor enzyme GlnD, under nitrogen deficiency conditions. Thus, PII proteins serve as the central processing unit for the integration of antagonistic signals of carbon and nitrogen status, and use this information to control nitrogen assimilation.

In diazotrophic microorganisms, PII proteins role is extended to the control of the nitrogen fixation process. The genus *Azospirillum* is composed of free-living diazotrophs capable of beneficial association with a variety of Graminae plants, such as sugarcane and rice. In order to appraise the regulatory systems of nitrogen fixation and metabolism in the model organism *Azospirillum amazonense*, an investigation of the PII proteins functions in these networks was proposed. The cellular targets of each of the PII paralogues found in *A. amazonense* – named GlnB and GlnK – were investigated by pull-down assays. Two protein extracts of *A. amazonense* were tested, referring to growth conditions of nitrogen limitation and sufficiency. Altogether, 42 potential interacting partners of the unmodified form of the two PII proteins were identified by LC-MS/MS, and these interactions are to be further confirmed by alternative methods. It is noteworthy that 10 transcriptional factors were isolated in our experiments. These factors may represent linking points for the cross-talk between nitrogen regulation and other regulatory systems, such as the control of exopolysaccharide biosynthesis and the redox control of energetic processes. Besides these transcriptional regulators, our results comprise 2 proteins related to heavy metals metabolism, 2 transporters, 12 metabolic enzymes, 7 housekeeping function proteins and 9 unknown function proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O elemento nitrogênio

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, correspondendo aproximadamente a 79% da sua constituição. No entanto, entre os elementos essenciais à vida, como carbono, fósforo, oxigênio e enxofre, é o único que não está disponível em reservatórios globais capazes de sustentar as diversas formas de vida. Mais de 99% da massa de nitrogênio da Terra não está acessível a mais de 99% dos organismos vivos (GALLOWAY *et al.*, 2003). Isto se deve ao fato de sua forma predominante – o dinitrogênio (N_2) – ser bastante inerte e não estar quimicamente disponível à maioria dos seres vivos. A estabilidade da tripla ligação do $N\equiv N$, que possui uma energia de dissociação de 940kJ contra 493kJ da dupla ligação do O_2 , é a responsável por esta inacessibilidade (MADIGAM *et al.*, 2004).

O nitrogênio reduzido é um componente integral de proteínas, ácidos nucleicos e de uma grande variedade de biomoléculas. Por isso, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) – i.e., a redução do N_2 atmosférico a NH_3 , catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase, por bactérias simbióticas, associativas ou de vida livre – é essencial para o crescimento e sobrevivência de todos os organismos. Apenas um número relativamente pequeno de microrganismos, denominados diazotróficos, é capaz de realizar este processo (KIM & REES, 1994). Na biosfera, os processos metabólicos de diferentes espécies atuam interdependentemente para recuperar e reutilizar o nitrogênio biologicamente disponível através de um vasto ciclo do nitrogênio (NELSON & COX, 2005), esquematizado na Figura 1.1.

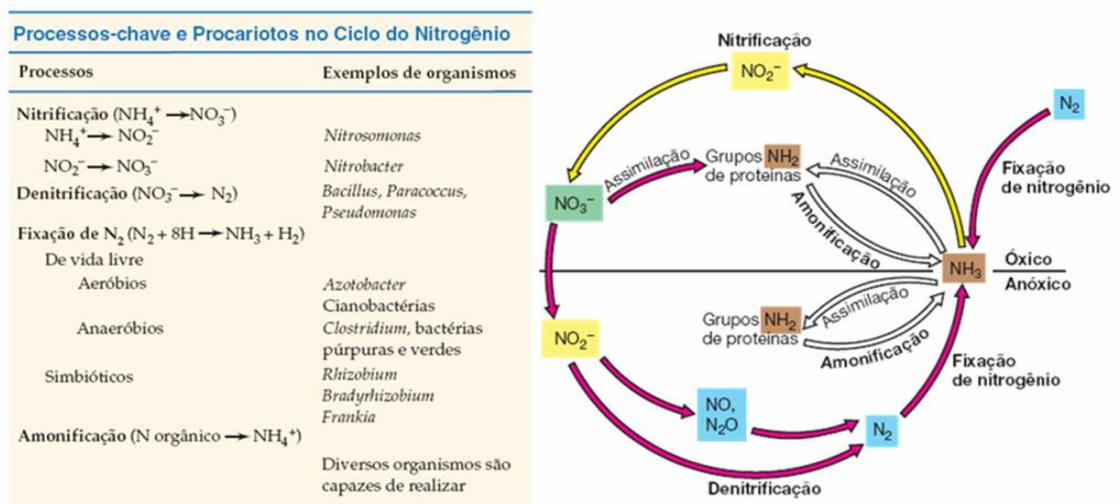


FIGURA 1.1 O ciclo redox do nitrogênio. As reações de oxidação são indicadas pelas setas amarelas e as de redução pelas setas vermelhas. Modificado de MADIGAM *et al.*, 2004.

Como pode ser observado na Figura 1.1, as atividades microbianas governam o ciclo global do nitrogênio. De fato, a distribuição geográfica das espécies bacterianas está intimamente relacionada à acessibilidade de nutrientes. A fim de utilizar fontes de nitrogênio diversas para sobreviver a situações de limitação deste elemento, os microrganismos desenvolveram mecanismos de adaptação do seu metabolismo a uma fonte inconstante de nitrogênio. Isso se reflete no número de sistemas de percepção, transporte e assimilação para diferentes fontes presente em cada espécie e na variabilidade destes entre os táxons. Além disso, sofisticados mecanismos de controle garantem que sistemas de captação e assimilação energeticamente eficientes sejam preferencialmente utilizados, de forma a montar uma resposta adequada a cada situação de disponibilidade nutricional (BURKOVSKI, 2007). Essa versatilidade metabólica é ainda mais importante para microrganismos que habitam o solo, onde o nitrogênio é um fator especialmente limitante (REUTHER & WOHLLEBEN, 2007).

A disponibilidade de nitrogênio fixado é frequentemente um fator limitante para a produtividade agrícola. O aumento do uso de fertilizantes químicos, que constituem a maior interferência do homem no ciclo do nitrogênio, tem gerado preocupações relacionadas à crescente emissão de óxidos de nitrogênio, acidificação do solo e eutroficação da água (DIXON & KAHN, 2004). Um manejo eficiente do nitrogênio no ambiente geralmente requer a presença da FBN, pois o nitrogênio desta fonte é produzido *in situ*, sendo usado diretamente pela planta. Portanto, é menos suscetível à volatilização, denitrificação e lixiviação (GRAHAM & VANCE, 2000). De acordo com

estatísticas da FAO (2001), cerca de 42 milhões de toneladas de fertilizantes são aplicadas anualmente em escala global na produção de trigo, arroz e milho. As plantações são capazes de utilizar cerca de 50% do nitrogênio dos fertilizantes, enquanto que 25% desse é perdido do sistema solo-planta, causando não apenas uma perda econômica de US\$ 3 bilhões, como também a poluição do ambiente (SAIKIA & JAIN, 2007). A fixação biológica do nitrogênio representa, assim, um importante insumo à agricultura sustentável, tendo, desta forma, despertado grande interesse da comunidade científica.

1.2 O gênero *Azospirillum*

O gênero bacteriano *Azospirillum* pertence à subclasse α das proteobactérias, a qual comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas a plantas, tais como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter* (HARTMANN & BALDANI, 2006). Até o momento, 14 espécies foram descritas. As bactérias deste gênero possuem distribuição mundial e ocorrem em grandes números (até 10^7 /g) na rizosfera e em associação com raízes, caules e folhas de uma extensa variedade de plantas. Tanto *Azospirillum brasilense* quanto *Azospirillum lipoferum* foram isoladas de 30 a 90% das amostras de solo e rizosfera coletadas por todo o mundo. São encontradas principalmente em climas tropicais, mas também em temperados (DÖBEREINER *et al.*, 1976; HARTMANN & BALDANI, 2006). São bactérias de vida livre altamente móveis, podendo apresentar um comportamento aerotático vantajoso para sua migração a nichos de aerofilia ideal para a fixação do nitrogênio (ZHULIN *et al.*, 1996). Colonizam predominantemente a superfície das raízes, mas como algumas linhagens são capazes de infectar plantas, são classificadas como microrganismos endofíticos facultativos (PATRIQUIN *et al.*, 1983).

Azospirillum apresenta um metabolismo de carbono e nitrogênio bastante versátil, o que lhe confere competitividade para colonizar a rizosfera. Amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular podem servir como fontes de nitrogênio (HARTMANN & ZIMMER, 1994). Em determinadas condições ambientais, *Azospirillum* pode influenciar positivamente o crescimento vegetal, o rendimento de safras e o conteúdo de nitrogênio das plantas. Este efeito estimulatório tem sido atribuído a vários mecanismos, incluindo a fixação biológica do nitrogênio e a produção

de hormônios de crescimento vegetal como a auxina. No entanto, a contribuição da FBN nesta resposta vem sendo questionada, uma vez que estas bactérias não excretam altas quantidades de amônia durante o crescimento diazotrófico (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Outros fatores devem ser levados em consideração, tais como a produção de substâncias promotoras de crescimento (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980), o aumento da taxa de absorção de minerais pelas raízes (LIN *et al.*, 1983) ou ainda a supressão de doenças pela competição com microrganismos patogênicos a plantas (BERG, 2009). No entanto, os mecanismos de ação de *Azospirillum* nas plantas ainda estão por serem elucidados (GADAGI *et al.*, 2004).

1.2.1 *Azospirillum amazonense*

A espécie *Azospirillum amazonense* foi descrita em 1983, tendo sido isolada da rizosfera e das raízes de gramíneas da região da Amazônia brasileira (MAGALHÃES *et al.*, 1983). Esta espécie já foi encontrada em sementes de cereais, em raízes e caules de cana-de-açúcar e em frutos de palmeiras (BALDANI *et al.*, 1997). Experimentos com cana-de-açúcar e outras culturas sugerem a existência de um efeito sinérgico ou aditivo quando *A. amazonense* é usado como inoculante em combinação com outros diazotróficos (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Além disso, nos estudos de Rodrigues *et al.* (2008), a FBN contribuiu com 6 a 27% do teor de N de plantas de arroz inoculadas com diferentes isolados de *A. amazonense* (RODRIGUES *et al.*, 2008).

A. amazonense difere das outras espécies do gênero em algumas características importantes. Entre elas, a morfologia colonial, a enzima nitrogenase com menor tolerância ao oxigênio, a inabilidade de desnitrificação, a capacidade de utilizar sacarose (mas não frutose nem citrato) como fonte de carbono e o crescimento dependente de N₂ mais lento. Uma peculiaridade é a tolerância a pHs ácidos, condição comum em solos brasileiros (MAGALHÃES *et al.*, 1983), o que sugere uma melhor adaptação. Outra característica importante da espécie *A. amazonense* é a aparente capacidade de fixar N mesmo na presença de amônia: enquanto que a FBN é completamente inibida na presença de 1mM de NH₄Cl nas espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum*, *A. amazonense* apresenta apenas uma inibição parcial na presença de 10mM de NH₄Cl (HARTMANN *et al.*, 1986).

1.3 Assimilação de nitrogênio em bactérias

Quando o crescimento de um microrganismo é limitado pela fonte de nitrogênio, uma resposta regulatória promove o aumento da produção do aparato de assimilação deste nutriente. Respostas ao nitrogênio variam consideravelmente de acordo com a fonte e com o espectro filogenético. Mesmo assim, em Bacteria e Euryarcheota, os mecanismos regulatórios do nitrogênio são, na sua maioria, centralmente controlados por uma família de proteínas altamente conservadas chamadas de PII (LEIGH & DODSWORTH, 2007).

Vários organismos usam diversas fontes de nitrogênio, incluindo amônia, nitrato, dinitrogênio, uma variedade de aminoácidos e outros compostos orgânicos nitrogenados. Fontes de nitrogênio alternativas são convertidas à amônia, muitas vezes à custa de ATP e elétrons. A utilização de fontes caras ou pobres é tipicamente regulada para minimizar o gasto em termos de energia e balanço redox da célula (LEIGH & DODSWORTH, 2007).

A via predominante e universalmente conservada para a assimilação de nitrogênio em todos os organismos procarióticos capazes de utilizar amônia é chamada de via da glutamina sintetase (GS)/ glutamato sintase (ou glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase, GOGAT), cujas atividades estão ilustradas na Figura 1.2. A maioria das bactérias de vida livre encontra-se apta a este estilo de vida prototrófico (FORCHHAMMER, 2007). O produto primário da assimilação de amônia são o glutamato (Glu) e glutamina (Gln), os principais doadores de nitrogênio intracelulares. Em *Escherichia coli*, glutamina fornece nitrogênio para as purinas, pirimidinas, asparagina, triptofano, histidina, glucosamina, *p*-aminobenzoato e arginina, sendo o glutamato o principal doador para a maioria das transaminases (REITZER, 2003). Em situações específicas, onde GOGAT não ocorre, organismos usam glutamato desidrogenase (GDH) para fazer glutamato a partir de 2-oxoglutarato (2OG) e amônia (ver Figura 1.2). Assim, 2-oxoglutarato, o precursor da assimilação de amônia, sinaliza deficiência de nitrogênio, enquanto que o produto completamente aminado, glutamina, geralmente sinaliza suficiência de nitrogênio (LEIGH & DODSWORTH, 2007). 2OG pode ser considerado ainda, em microrganismos que possuem a GDH, como um indicador dos níveis de esqueleto de carbono disponíveis para assimilação de glutamina (FORCHHAMMER, 2008).

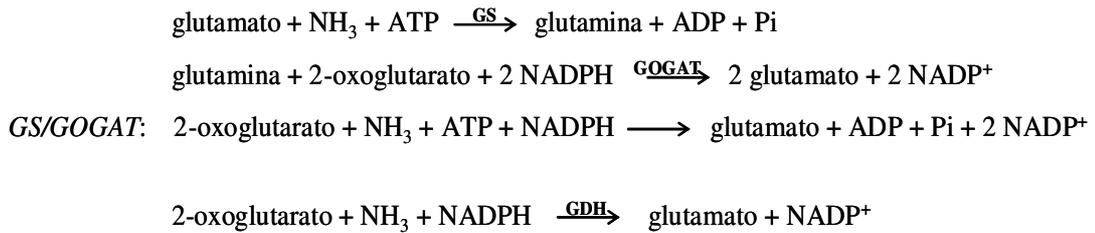


FIGURA 1.2 Atividades da via GS/GOGAT e de GDH. Adaptado de REITZER, 2003 e FORCHHAMMER, 2007.

A via GS/GOGAT é mais apropriada para a assimilação de amônia em um ambiente limitado em termos de nitrogênio, já que GS tem um Km para amônia muito menor que GDH. A assimilação de amônia pela via GS/GOGAT possui um custo de surpreendentes 15% da necessidade de ATP celular, o que é calculado pelo fato da síntese de 1g de massa celular de *E. coli* requerer 40 mmoles de carbono, cerca de 11 mmoles de nitrogênio e 72 mmoles de ATP (LENGELER *et al.*, 1999; REITZER, 2003).

1.3.1 A regulação da atividade da glutamina sintetase

O estudo da regulação do metabolismo do nitrogênio teve como marco o trabalho de Earl Stadman (1968) sobre a regulação da GS em *E. coli*, o qual resultou no descobrimento das proteínas de transdução de sinal PII (STADTMAN *et al.*, 1968). A enzima glutamina sintetase (GS) é alvo de complexa regulação, sendo inibida por mecanismo de *feedback* por diversos produtos do seu metabolismo (LEIGH & DODSWORTH, 2007). Além disso, a regulação da atividade de GS é exercida pela modulação da expressão de seu gene estrutural, *glnA*, e da sua modificação pós-traducional, através de adenilação/deadenilação pela enzima bifuncional adenililtransferase (ATase). A forma adenililada de GS é inativa, mas pode ser rapidamente ativada por deadenililação (JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998c).

Em *E. coli*, três proteínas são importantes para o processo de regulação da GS: a enzima ATase, a proteína de transdução de sinal PII (ou GlnB) e a enzima uridiltransferase/uridilremovedora UTase/UR (também chamada de GlnD). A glutamina e o 2-oxogluturato foram identificados como efetores alostéricos do processo. A enzima UTase/UR (GlnD) é um sensor primário dos níveis de glutamina que transfere um grupamento uridila (UMP) para uma tirosina específica de cada um dos três monômero da proteína PII quando há deficiência de nitrogênio. PII uridilada estimula a atividade

deadeniladora da ATase ao se ligar a essa última, promovendo a ativação de GS (JIANG *et al.*, 1998c; NINFA & ATKINSON, 2000). Esse processo ocorre de maneira reversível: sob excesso de nitrogênio, GlnD deuridila PII, que estimula a adenilação da GS pela enzima ATase, como mostra a Figura 1.3. Tanto PII como PII-UMP se associam diretamente com a ATase, sendo que o estado de uridilação determina o seu efeito sobre esta enzima (JAGGI *et al.*, 1997; LEIGH & DODSWORTH, 2007).

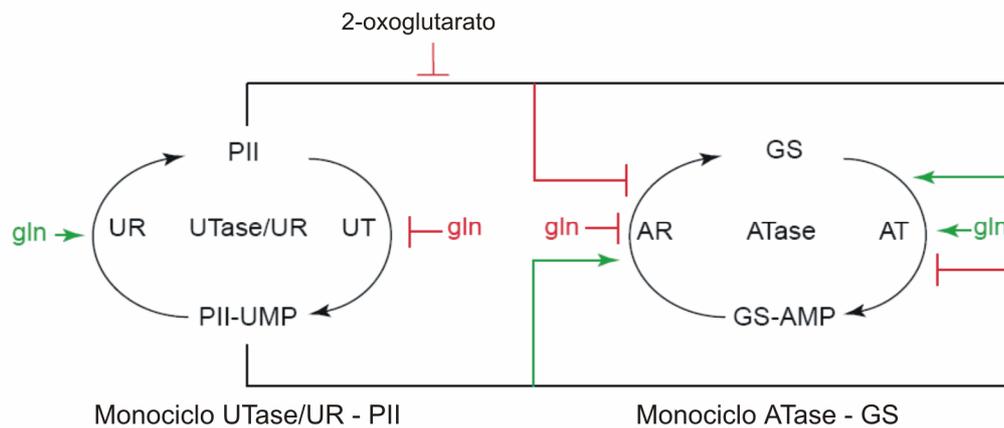


FIGURA 1.3 Regulação da atividade da glutamina sintetase (GS) por PII. Efeitos de ativação estão representados em verde, enquanto que efeitos de inibição estão marcados em vermelho. Os efeitos de 2-oxoglutarato mostrados referem-se a concentrações altas dentro do nível fisiológico, ou seja, concentrações em que o segundo e terceiro sítios de ligação do trímero de PII estão ocupados. A forma adenilada de GS (GS-AMP) encontra-se inativa, enquanto que a forma não modificada fornece glutamina para a célula. Adaptado de NINFA & JIANG, 2005.

1.3.2 Regulação transcricional do metabolismo de nitrogênio: o sistema Ntr

A regulação do metabolismo do nitrogênio tem sido estudada extensivamente em bactérias entéricas, nas quais uma cascata regulatória, chamada de sistema regulatório geral do nitrogênio (Ntr), controla a expressão de fontes alternativas de utilização desse elemento. Uma cascata regulatória similar é operacional na maioria das proteobactérias já estudadas (HUERGO *et al.*, 2003). O sistema Ntr envolve uma série de proteínas. Entre elas podemos citar as proteínas NtrB e NtrC, produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*, que funcionam como um sistema regulatório de dois componentes controlado por PII. NtrB é uma histidina cinase que se autofosforila e após transfere o grupamento fosfato para NtrC em condições de limitação de nitrogênio (PIOSZAK & NINFA, 2003). NtrC é um EBP procariótico (*enhancer binding protein*) ativador de promotores dependentes do fator sigma 54 (σ^{54}) – tipicamente relacionados a transcrição de genes ligados ao metabolismo de nitrogênio. A forma não fosforilada de

NtrC é um dímero em solução capaz de se ligar ao sítio UAS (*upstream activating sequence*) das regiões regulatórias de diversos genes e também ao ATP. Em resposta a fosforilação, NtrC forma oligômeros que são capazes de hidrolizar ATP e, conseqüentemente, promover a abertura da bolha de transcrição da σ^{54} -RNAP, ativando a transcrição (WEDEL & KUSTU, 1995; TWERDOCHLIB *et al.*, 2003).

Quando os níveis de nitrogênio celular são suficientes, PII (deuridilada) liga-se a NtrB, e este complexo promove a defosforilação de NtrC-P, cessando a ativação da transcrição de genes *ntr*. Ainda não se encontra bem elucidado se este efeito é decorrente de uma atividade de fosfatase do complexo PII-NtrB ou se esse complexo atua estimulando a atividade de autofosfatase intrínseca de NtrC-P (PIOSZAK & NINFA, 2004). De fato, sabe-se que NtrC-P possui uma atividade de autofosfatase relativamente lenta, sendo perdida quando a proteína é desnaturada (KEENER & KUSTU, 1988; WEISS & MAGASANIK, 1988). No trabalho de Pioszak e Ninfa (2004) foram isolados mutantes de NtrC resistentes a defosforilação pelo complexo NtrB-PII. Um destes mutantes apresentou um resíduo mutado no domínio receptor da fosforilação (K104Q). Este resíduo é necessário para ambas as atividades de autofosfatase e de fosfatase regulada por PII-NtrB, sugerindo que NtrB-PII atuaria ativando a atividade de autofosfatase (PIOSZAK & NINFA, 2004; JIANG & NINFA, 2009a).

Resumidamente, podemos dizer que PII atua inibindo a atividade cinásica de NtrB e promovendo a defosforilação do fator transcricional NtrC. Apenas a forma deuridilada de PII, referente à condição de suficiência de nitrogênio, é capaz de se ligar a NtrB e promover tais respostas (JIANG & NINFA, 2009a). A Figura 1.4 ilustra o sistema regulatório Ntr.

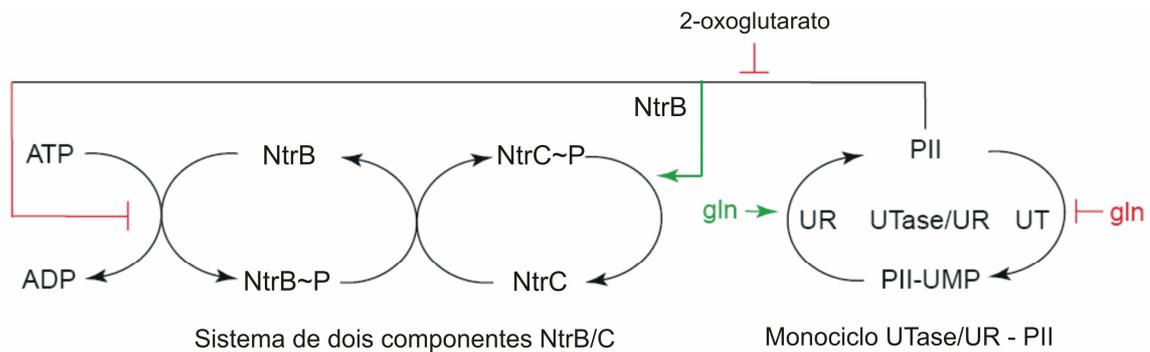


FIGURA 1.4 Sistema regulatório geral do nitrogênio (Ntr). Efeitos de ativação estão representados em verde, enquanto que efeitos de inibição estão marcados em vermelho. Os efeitos de 2-oxoglutarato mostrados referem-se a concentrações altas dentro do nível fisiológico, ou seja, concentrações em que o segundo e terceiro sítios de ligação do trímero de PII estão ocupados. A forma fosforilada do fator transcrricional NtrC promove a ativação de diversos promotores dependentes do fator σ^{54} relacionados ao metabolismo de nitrogênio. Adaptado de NINFA & JIANG, 2005.

Em *Klebsiella pneumoniae*, um diazotrófico em que este sistema já foi estudado com algum detalhe, NtrC fosforilada ativa a transcrição de vários genes envolvidos na fixação e na assimilação de nitrogênio, tais como *glnA* (que codifica a glutamina sintetase – GS), *amtB* (que codifica um transportador de amônia), *glnK* (uma proteína PII de transdução de sinal) e *nifA* (ativador de transcrição de genes da fixação do nitrogênio) (ZHANG *et al.*, 2005).

Zimmer *et al.* realizaram um trabalho de mapeamento do regulon de NtrC em *E. coli*, por experimentos de microarranjo, comparando os níveis de mRNA em um linhagem que superexpressa genes ativados por NtrC com uma linhagem mutante para este ativador. Além dos genes já conhecidamente regulados por NtrC, como *glnA* e *amtB*, também foram identificados vários genes para sistemas de transporte de compostos nitrogenados, incluindo compostos reciclados durante a síntese de parede celular, o que leva a crer que a procura por novas fontes parece ser a resposta primária à falta de nitrogênio. NtrC também controla a transcrição de genes de diferentes reguladores, como o seu próprio gene *ntrC*, o de sua fosfatase cognata *ntrB*, o da proteína PII *glnK* e da proteína de controle de assimilação do nitrogênio *nac* (*nitrogen assimilation control*). De modo geral, cerca de 2% do genoma de *E. coli* parece estar sob regulação de NtrC, embora a transcrição de alguns operons dependa da proteína Nac. Esta última ativa a transcrição de promotores dependentes do fator σ^{70} , enquanto que NtrC ativa transcrição de promotores- σ^{54} . Assim, já que tem sua produção

controlada por NtrC, Nac serve como um adaptador entre NtrC e promotores dependentes do fator σ^{70} (ZIMMER *et al.*, 2000).

1.4 As proteínas PII de transdução de sinal

As proteínas PII constituem uma superfamília de proteínas triméricas altamente conservadas, estando entre as proteínas transdutoras de sinal mais amplamente distribuídas, com exemplares em bactérias, arqueas e no cloroplasto de vegetais superiores (NINFA & JIANG, 2005). A partir da sua descoberta inicial, em 1969, como o segundo pico eluído de uma coluna de gel filtração – daí o nome PII – tem-se dimensionado o papel significativo que esta família de proteínas desempenha na coordenação do metabolismo do nitrogênio. Nos últimos anos, o desenvolvimento da genômica bacteriana, juntamente com a descoberta do envolvimento de PII em uma gama de fenômenos regulatórios nestes organismos, levou à descoberta de que os membros da família PII são ubíquos entre as bactérias (ARCONDEGUY *et al.*, 2001). Em Bacteria e Archaea, as proteínas PII desempenham o papel de unidade processadora central para a integração de sinais dos níveis de nitrogênio, carbono e energia, usando essa informação para controlar a assimilação de nitrogênio (NINFA & ATKINSON, 2000).

Proteínas PII respondem a três sinais metabólicos: glutamina, 2OG e ATP. A informação sobre glutamina é transmitida pela sua uridilação reversível, catalisada pela enzima UTase/UR (GlnD), o que parece ocorrer somente em proteobactérias. Outros grupos bacterianos utilizam processos parecidos: PII de Actinobacteria são adeniladas (ARCONDEGUY *et al.*, 2001) e de Cianobactérias são fosforiladas de maneira dependente de nitrogênio (OSANAI & TANAKA, 2007). Já 2OG e ATP são detectados diretamente por PII através da ligação direta destes efetores ao trímero da proteína, o que parece ser um mecanismo universal para toda a diversidade de PII (JIANG & NINFA, 2009b).

1.4.1 Os efetores de PII: indicação da fisiologia celular

Na ausência de ATP e 2OG a proteína GlnB se encontra aparentemente inativa (LEIGH & DODSWORTH, 2007). Estes dois efetores ligam-se a PII (e a PII-UMP) de forma altamente sinérgica em níveis micromolares (JIANG & NINFA, 2007). Na

bactéria *Salmonella typhimurium*, níveis fisiológicos de ATP foram estimados em valores de 3 mM (BOCHNER & AMES, 1982). Em *E. coli* e presumidamente em outras bactérias, todos os três sítios de ATP estão saturados em concentrações fisiológicas (JIANG *et al.*, 1998c; FORCHHAMMER, 2007). Isso levou à sugestão de que os níveis de ATP não possuem um papel regulatório *in vivo*, já que PII possuiria três moléculas de ATP ligadas em qualquer condição fisiológica (KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998a).

A questão da regulação por ATP tem sido analisada pelos pesquisadores Ninfa e Jiang, que têm proposto que PII atua como um sensor dos níveis de carga energética de adenililato, uma medida de energia disponível para o metabolismo, governada pela proporção de ADP/ATP. Foi observado que ADP liga-se a PII nos mesmos sítios de ATP de forma competitiva. Como ATP e 2OG ligam-se a PII de forma sinérgica, e ADP e 2OG de forma não sinérgica, ADP e 2OG atuam de forma antagonista na regulação da atividade dos receptores na presença de ATP. Em experimentos de reconstituição dos ciclos de ativação de ATase e NtrB de *E. coli* por PII (e PII-UMP) *in vitro*, foi observado que essas funções são essencialmente influenciadas pela presença de ADP. Alguns dos experimentos sugerem que os três sítios de ligação a nucleotídeos do trímero de PII podem conter misturas de ATP e ADP. Assim, a comunicação entre as subunidades é necessária para da sinalização da carga de adenililato, evidenciando a importância da estrutura trimérica de PII. Isso explica a conservação da estrutura trimérica mesmo quando a interação de apenas um monômero com o receptor seja suficiente para a ativação das respostas (JIANG & NINFA, 2007; JIANG & NINFA, 2009a; JIANG & NINFA, 2009b).

Diferentemente da ação do ATP, as propriedades de 2OG sugerem um papel regulatório claro: a ligação da primeira molécula de 2OG ocorre avidamente, no entanto inibe a ligação das próximas duas moléculas. Essa cooperação negativa é superada em concentrações correspondentes aos níveis mais altos da faixa fisiológica de 2OG, que ocorrem quando há falta de nitrogênio celular. Enquanto que PII ligada a uma molécula de 2OG é efetiva na ativação de ATase e NtrB em sistemas reconstituídos *in vitro*, PII ligada a 2 ou 3 moléculas teve tais atividades reduzidas ou abolidas (KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG & NINFA, 2009a).

1.4.2 Estrutura de PII

Proteínas PII são homotrimeros cilíndricos pequenos (~ 112 aminoácidos, 12-13 kDa) que apresentam 3 loops (1 por subunidade) protuberantes expostos ao solvente. Esses loops, chamados de loop T, são particularmente importantes para a função de PII, sendo bastante flexíveis e adotando diversas conformações durante experimentos de cristalização (FORCHHAMMER, 2008). Possivelmente esses loops formam uma estrutura estável apenas quando interagindo com os receptores celulares (SAKAI *et al.*, 2005). Cada subunidade de PII possui um dobramento tipo ferredoxina (β - σ - β fold). Além do loop T, também existem outros dois loops menores, chamados de loop B e C (CHEAH *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1998). A estrutura principal de uma PII típica se encontra ilustrada na Figura 1.5.

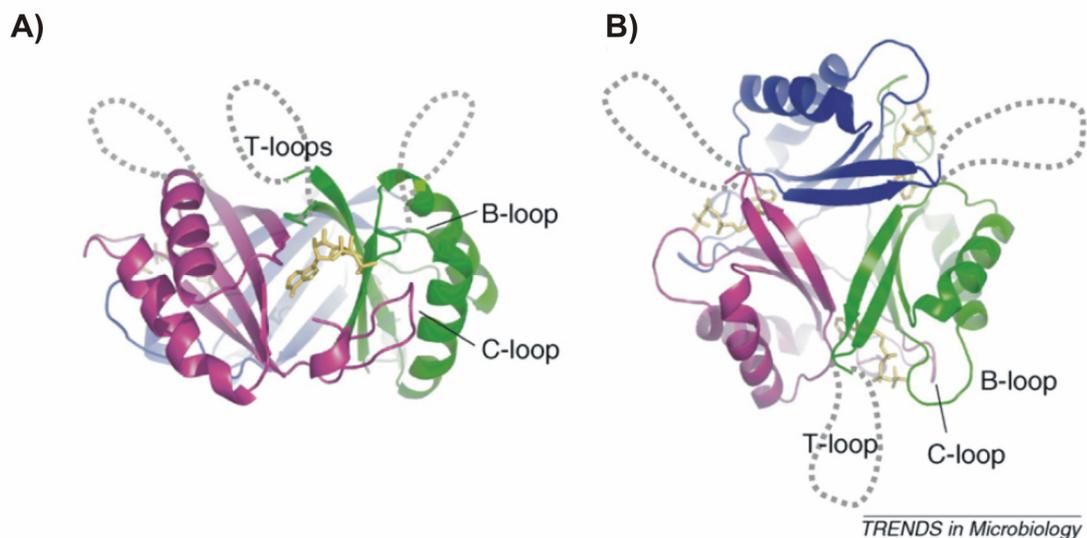


FIGURA 1.5 Estrutura das proteínas PII. Diagrama da PII trimérica vista de lado (A) ou vista de lado na face do T loop (B). Representando a estrutura típica de PII, a estrutura cristalográfica de GlnK de *E. coli* complexada a ATP é mostrada (PDB: 2gnk). As subunidades são roxas, verdes e azuis; ATP ligado está em amarelo. Os loops T flexíveis estão representados por linhas pontilhadas representando estruturas arbitrárias (já que estão desorganizados no cristal). Cada subunidade constitui um dobramento β - α - β duplo (dobramento tipo ferredoxina). O núcleo triangular das folhas β antiparalelas está cercado por duas α hélices e três loops por subunidade. Os dois loops menores (B e C) se estendem para a fenda entre as subunidades, de forma que os loops B e C de cada subunidade ficam frente a frente como um fórceps, formando parte do sítio de ligação a nucleotídeo, como pode ser observado na vista A. Retirado de FORCHHAMMER, 2008.

O loop T possui uma tirosina no seu ápice, a Tyr 51, que serve como sítio específico de uridilação pela enzima GlnD. O loop T parece ser necessário para a interação com as proteínas alvo, uma vez que a deleção dos resíduos 47 a 53 resultou na inabilidade de estimular a atividade de adeniltransferase da enzima ATase e a atividade

de fosfatase de NtrB (JIANG *et al.*, 1997; LEIGH & DODSWORTH, 2007). A estrutura cristalográfica de GlnK ligada ao ATP sugere que este se posiciona na fenda entre as subunidades, contatando os dois monômeros adjacentes (ver Figura 1.5) (XU *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2001), de forma que cada trîmero de PII possui três sítios de ligação idênticos. O ligante fica embebido na cavidade formada por dois loops adjacentes (loop B e C). Ao contrário do loop T, o loop B forma um elemento estrutural estável, e quando mutado causa efeitos em todas as funções de PII (CHEAH *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2001).

O sítio específico de ligação a 2OG ainda não se encontra totalmente estabelecido. Estudos cristalográficos de GlnK de *Methanocaldococcus jannaschii* complexado a ATP e 2OG podem explicar por que a ligação aos efetores afeta a interação com os seus alvos: a ligação de Mg-ATP faz com que o loop T assumira uma formação compacta que, em troca, cria um sítio de ligação para 2OG na base deste loop. Isso explicaria por que a ligação de 2OG parece ser dependente de ATP em muitos sistemas. O efeito dos ligantes ATP e 2OG sobre o loop T seria o responsável pela modulação da atividade dos receptores celulares (YILDIZ *et al.*, 2007). No entanto, o sítio de 2OG proposto não é universalmente conservado em PII e mutações nessa parte do loop não afetaram a ligação de 2OG em GlnB de *Escherichia coli* (JIANG *et al.*, 1997; FORCHHAMMER, 2008).

1.4.3 Classificação das proteínas PII

As proteínas da superfamília PII são classificadas com base na similaridade de sequência e na organização transcricional. Existem no momento quatro subtipos de proteínas PII: GlnB, GlnK, NifI e PII-NG (SANT'ANNA *et al.*, 2009). GlnB é o protótipo do grupo, sendo a primeira a ser descoberta em estudos de assimilação de nitrogênio em *E. coli* no final da década de 60. O seu gene *glnB* encontra-se tipicamente organizado em operon com o gene *glnA*, que codifica a glutamina sintetase e, em alguns casos, com o gene *nadE*, que codifica uma NAD(+) sintetase dependente de glutamina. Na década de 90, um parâlogo de GlnB, apresentando estrutura quase idêntica, foi descrito (VAN HEESWIJK *et al.*, 1995; VAN HEESWIJK *et al.*, 1996). Esta proteína foi chamada de GlnK. A definição do grupo GlnK geralmente se dá pela sua organização em operon com o gene *amtB* (*ammonium transporter*), que codifica um transportador de amônia. No entanto, existem diversas exceções para a classificação

baseada no contexto gênico. Notadamente, o gene *glnK* de *Azospirillum brasilense* não apresenta um gene *amtB* em suas adjacências, e sim o gene *aat*, que codifica uma aspartato aminotransferase. Por isso, apesar de ser do tipo GlnK, a proteína correspondente foi chamada de GlnZ (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). A classificação em GlnB e GlnK parece ser mais consistente para o grupo das Proteobacterias (SANT'ANNA *et al.*, 2009).

O terceiro grupo, NifI, é composto por proteínas PII bastante distintas, e sua distribuição é limitada à arqueas fixadoras de nitrogênio e algumas bactérias anaeróbicas. Genes *nifI* estão geneticamente ligados a genes codificantes para a enzima nitrogenase. Funcionalmente, participam do sistema de desligamento da enzima nitrogenase em função dos níveis de nitrogênio fixado, sendo que a proteína NifI interage fisicamente com a nitrogenase deste grupo bacteriano (DODSWORTH & LEIGH, 2006; LEIGH & DODSWORTH, 2007).

O quarto grupo, PII-NG (PII – *New Group*), foi descrito recentemente por estudos bioinformáticos. É composto de proteínas PII putativas encontradas em ilhas gênicas de resistência a metais pesados, pontualmente distribuídas entre bactérias de todas as subdivisões do grupo das Proteobacterias (com exceção de Epsilon). A maioria destes genes apresentou-se associado ao operon *czcCBA*, que codifica para um transportador de metais como Co²⁺, Zn²⁺ e Cd²⁺. Até o momento, proteínas PII-NG não foram analisadas experimentalmente (SANT'ANNA *et al.*, 2009).

1.4.4 GlnK: um segundo nível de regulação

A presença de duas proteínas do tipo PII é quase universal entre proteobactérias. Estudos filogenéticos demonstram que proteínas GlnB e GlnK se dividem em dois grupos consistentes. Filogeneticamente proteínas GlnB estão mais relacionadas entre si do que com seus respectivos parálogos GlnK. Isso sugere um evento de duplicação gênica anterior à divergência das diversas espécies proteobacterianas (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Em *E. coli*, GlnB e GlnK apresentam 67% de identidade da sequência de aminoácidos e possuem estrutura bastante semelhante, sendo homólogas em todos seus domínios. GlnK apresenta um mecanismo de regulação similar à descrita para GlnB no que diz respeito a uridilação pela mesma enzima UTase/UR, dependência dos níveis de Gln, ligação a 2OG e interação com uma variedade de alvos celulares (LEIGH & DODSWORTH, 2007). De fato, mutantes nulos para *glnB* apresentam apenas efeitos

parciais, indicando que a função de GlnK se sobrepõe com a de GlnB (VAN HEESWIJK *et al.*, 1996). Esses resultados levantam a discussão do motivo da existência de uma segunda proteína PII em Proteobacteria, sendo duas propostas consideradas para *E. coli*. Primeiro, GlnK é expressa apenas sob condições de limitação de nitrogênio (controlada pelo sistema GlnB-NtrB/NtrC), enquanto que GlnB é constitutiva. Assim, GlnB atuaria como o sensor primário de deficiência de nitrogênio enquanto que GlnK serviria para o ajuste das perturbações que ocorrem durante o período de privação (VAN HEESWIJK *et al.*, 1996; BLAUWKAMP & NINFA, 2002). Segundo, embora GlnB e GlnK sejam funcionalmente sobreponíveis, elas possuem especificidades diferentes para certas funções, o que muitas vezes é refletido por afinidades diferentes aos diversos alvos celulares (BLAUWKAMP & NINFA, 2002; LEIGH & DODSWORTH, 2007). Em microrganismos diazotróficos, a presença de uma segunda proteína PII é utilizada para a estridente regulação da fixação do nitrogênio, que representa um último recurso altamente dispendioso, enquanto que a outra PII assume as funções basais de assimilação de nitrogênio.

1.4.5 A associação de GlnK com AmtB: um novo princípio regulatório

A conservação da organização gênica de *glnK* e *amtB* por toda Proteobacteria sugeria um significado funcional e, de fato, foi demonstrado que GlnK se liga ao transportador de amônia AmtB, regulando sua atividade. Vários estudos indicam que GlnK é o ligante preferencial de Amt quando comparado aos outros parálogos de PII em Proteobacteria. É importante ressaltar ainda que a associação de PII com AmtB parece ocorrer por toda Bacteria e Euryarchaeota, sendo sugerida como uma função ancestral de PII (JAVELLE & MERRICK, 2005).

A estrutura de GlnK-AmtB de *E. coli* foi resolvida por estudos de cristalografia, sendo a primeira estrutura conhecida de um complexo PII-receptor (CONROY *et al.*, 2007; GRUSWITZ *et al.*, 2007). AmtB é uma proteína transmembrana homotrimérica, cujas subunidades possuem um poro estreito hidrofóbico que serve como um canal de gás de amônia. GlnK se liga a AmtB de forma simétrica, inserindo os loops T profundamente dentro da saída citoplasmática do poro, bloqueando a passagem de amônia. Já que o sítio específico de uridilação de GlnK, Y51, localizado na ponta deste loop, também fica inserido no poro, a uridilação impossibilita estericamente a complexação de GlnK a AmtB (CONROY *et al.*, 2007).

Experimentos *in vivo*, pelo menos para *E. coli*, demonstram que complexos GlnK-AmtB se formam apenas quando células previamente deprimidas de nitrogênio se deparam com uma fonte repentina de suprimento desse elemento, pois a síntese de GlnK requer condições de falta de nitrogênio, quando a proteína se acumula na forma uridilada. Em resposta a suplementação de N, GlnK-UMP se torna não modificada (e com menos 2OG ligado, já que esse é consumido durante a assimilação), somente assim podendo bloquear AmtB. Consequentemente, GlnK se realocaliza para a membrana e o citoplasma se torna altamente deficiente para essa proteína (JAVELLE *et al.*, 2004). Mais do que o simples bloqueio de AmtB, esse processo pode levar a uma série de consequências. Primeiro, a saturação de AmtB por GlnK impediria que GlnB se ligue a AmtB, o que poderia levar a sua inativação funcional. Segundo, o sequestro de GlnK para a membrana poderia prevenir a interação de GlnK com seus outros alvos celulares. Ainda mais, um novo princípio regulatório para GlnK tem sido proposto: o de realocalizar outras proteínas regulatórias (FORCHHAMMER, 2008). Esse processo foi descrito para o sistema de desligamento da nitrogenase em alguns microrganismos diazotróficos, descrito a seguir.

1.5 Regulação da fixação do nitrogênio

A habilidade de fixar nitrogênio atmosférico em amônia permite aos diazotróficos não somente sobreviver, como também proliferar em condições de privação de nitrogênio. Essa estratégia, no entanto, impõe uma despesa energética grande, uma vez que a nitrogenase consome 16 moles de ATP por mol de dinitrogênio fixado *in vitro*, sendo que esse custo energético sobe para até 40 moles de ATP *in vivo* (HILL, 1992). A inativação irreversível da nitrogenase pelo oxigênio também impõe restrições fisiológicas aos organismos diazotróficos, permitindo que eles utilizem a enzima nitrogenase somente em condições de baixas tensões de oxigênio. Portanto, o comprometimento celular em termos de síntese proteica e de consumo de ATP envolvidos com a fixação do nitrogênio é apropriado apenas em condições ambientais específicas (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). A concentração do oxigênio e a disponibilidade de nitrogênio fixado são, assim, fatores extremamente importantes na regulação da fixação do nitrogênio, e impõem princípios regulatórios comuns entre os diazotróficos. Entre as proteobactérias diazotróficas, isso se reflete através de

componentes regulatórios equivalentes e de vias de sinalização similares. No entanto, a plasticidade destas vias é bastante grande, revelando variações importantes que permeiam temas comuns (DIXON & KAHN, 2004).

1.5.1 Regulação pós-traducional da nitrogenase

Os níveis de oxigênio e de nitrogênio fixado controlam a expressão de genes *nif*, bem como regulam a atividade do complexo enzimático nitrogenase em nível pós-traducional. O complexo enzimático é formado por duas proteínas: a dinitrogenase, também chamada de molibdênio-ferro proteína, produto dos genes *nifDK*, e a dinitrogenase redutase, ou ferro (Fe) proteína, produto do gene *nifH* (ZHANG *et al.*, 1997). A modificação pós-traducional reversível da nitrogenase tem sido melhor caracterizada nas α -proteobactérias *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* e *Azospirillum brasilense* (HUERGO *et al.*, 2006a). Em resposta a condições desfavoráveis para a atividade da nitrogenase, tais como adição de amônia ao meio de cultura, um grupo ADP-ribose do NAD⁺ é ligado a um resíduo de arginina em uma subunidade da proteína NifH (dinitrogenase redutase), resultando na sua inativação. Esse processo é catalisado pela enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT). Quando a amônia do meio é esgotada pelo metabolismo celular, o grupo ADP-ribose é removido pela dinitrogenase redutase glicohidrolase ativadora (DraG), levando à ativação da NifH (POPE *et al.*, 1985).

As atividades das próprias enzimas DraT e DraG são reguladas pelos níveis de nitrogênio na célula, mas as vias de sinalização que medeiam esse controle não foram completamente elucidadas até o momento. Várias linhas de evidência têm indicado que as proteínas da família PII e a proteína AmtB (canal de amônia) estão envolvidas na regulação de DraG e DraT (HUERGO *et al.*, 2006b). Estudos de *Rhodobacter capsulatus* e de *Rhodospirillum rubrum* utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura demonstraram a interação de GlnB com DraT (PAWLOWSKI *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2006). Em *A. brasilense*, o estado de uridilação/deuridilação de ambas proteínas GlnZ (do tipo GlnK) e GlnB é coordenado com a ADP-ribosilação da dinitrogenase redutase (HUERGO *et al.*, 2006a).

Com base nestes dados, Huergo *et al.* realizaram diversos estudos para verificar a existência de interação *in vivo* e *in vitro* entre DraT/G com GlnB/Z em *Azospirillum brasilense*. Seus resultados demonstram que DraT interage com maior afinidade com a

forma deuridilada de GlnB tanto *in vitro* e *in vivo*. Estudos prévios mostraram que *in vivo* GlnB uridilada não interagia com DraT (HUERGO *et al.*, 2006a), porém experimentos *in vitro* demonstraram que essa interação existe de forma fraca e em condições bastante específicas (na presença de ADP, que atua como estabilizador) (HUERGO *et al.*, 2009). Também foi proposto que GlnB induz mudanças conformacionais em DraT. No caso de DraG, foi demonstrada a sua interação com GlnZ independentemente do estado de uridilação dessa última. A partir desses resultados propuseram o modelo ilustrado na Figura 1.6.

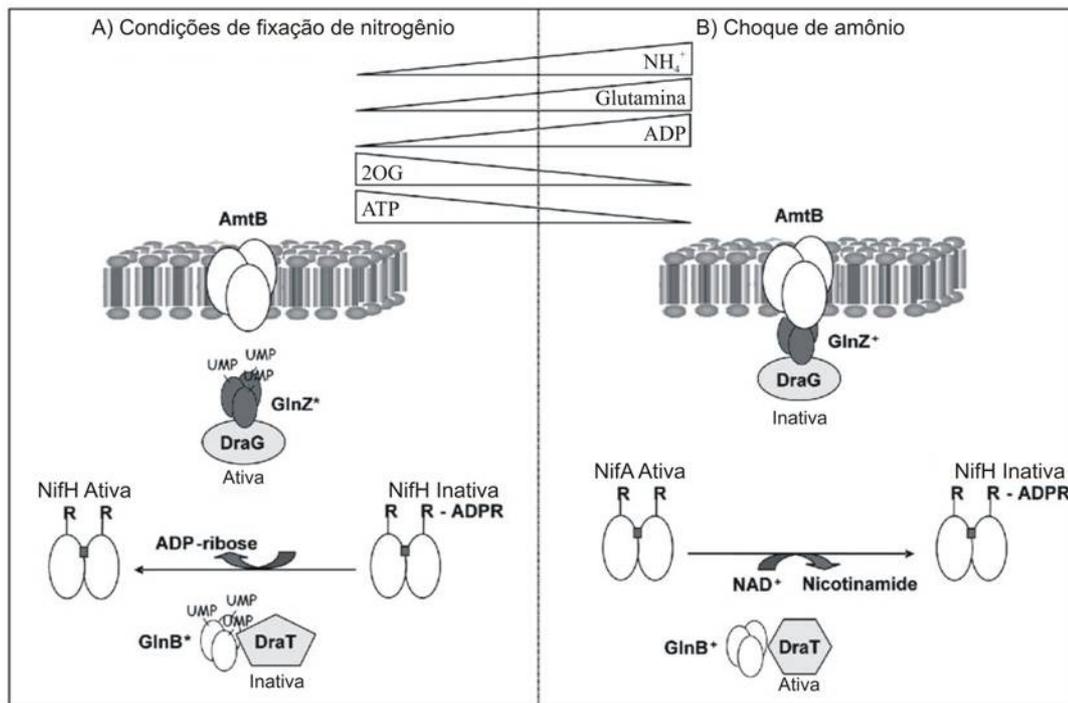


FIGURA 1.6 Modelo do papel de PII na regulação das enzimas DraT e DraG em resposta a disponibilidade de nitrogênio em *A. brasilense*. GlnB* e GlnZ* indicam proteínas totalmente uridiladas ligadas a ATP e 2OG. GlnB+ e GlnZ+ indicam proteínas deuridiladas ligadas a ADP. Em condições de fixação do nitrogênio, GlnB e GlnZ estão uridiladas e localizadas no citosol. DraT encontra-se inativa no citosol, enquanto que DraG está ativa devido à sua interação com GlnZ uridilada. Assim, DraG remove o grupo ADP-ribose da dinitrogenase redutase (NifH), ativando-a. B) Em condições de choque de amônia, GlnB e GlnZ são deuridiladas. GlnB deuridilada associa-se a DraT, fazendo com que esta adicione um grupo ADP-ribose e inative NifH. Concomitantemente, GlnZ deuridilada faz com que o complexo GlnZ/DraG se associe com o transportador de membrana AmtB, interrompendo o fluxo de amônio. O sequestro de DraG à membrana celular a separa fisicamente do seu substrato citoplasmático, NifH, inibindo o processo de remoção da ADP-ribose. Adaptado de HUERGO *et al.*, 2009.

Sob condições de fixação de nitrogênio, i.e. baixos níveis de Gln, acúmulo de 2OG e taxa de ATP/ADP alta, GlnB e GlnZ encontram-se uridiladas e ligadas a ATP e 2OG, o que resulta em uma associação fraca, se presente, com DraT e DraG, respectivamente. DraG está cataliticamente ativa e DraT não, o que faz com que NifH

(dinitrogenase reductase) não esteja modificada e, portanto, ativa. Após um choque de amônio, GlnB e GlnZ são deuridiladas pela UTase/UR, a concentração de 2OG cai e presumidamente a incorporação de amônia pela glutamina sintetase gera uma queda na proporção de ATP/ADP. GlnB e GlnZ, deuridiladas e ligadas a ADP, formam os complexos DraT-GlnB, DraG-GlnZ e AmtB-GlnZ. A ligação de GlnB a DraT presumidamente resulta na mudança conformacional e consequente ativação de DraT, que ADP-ribosila NifH, inativando a sua atividade de forma reversível. GlnZ atua impedindo a reativação de NifH por DraG formando um complexo terciário AmtB-GlnK-DraG. Consequentemente, DraG é sequestrada para a membrana, longe do seu substrato, tornando-se inativa (HUERGO *et al.*, 2006b; HUERGO *et al.*, 2006; HUERGO *et al.*, 2009).

1.5.2 Regulação transcricional da fixação do nitrogênio: a proteína NifA

Nas proteobactérias, os genes da fixação do nitrogênio (genes *nif*) são invariavelmente submetidos à regulação transcricional pela proteína ativadora NifA, junto com o fator sigma alternativo σ^{54} da RNA polimerase (também conhecido como RpoN, NtrA e σ^N) (DIXON & KAHN, 2004).

O fator σ^{54} liga-se reversivelmente ao núcleo da RNA polimerase ao reconhecer promotores com sequências consenso a -12 e -24 pb em relação ao ponto de início da transcrição. A holoenzima- σ^{54} forma um complexo fechado (em que a região promotora está em fita dupla) e ocupa o promotor neste estado antes da ativação (BUCK *et al.*, 2000). O remodelamento do complexo fechado em um complexo aberto, competente de transcrição, requer energia derivada da hidrólise de ATP catalisada por ativadores de transcrição. Assim, ao contrário da σ^{70} -RNA polimerase, a σ^{54} -RNA polimerase exige um ativador para o início da transcrição, e este ativador acopla a hidrólise de ATP à abertura do promotor (DOUCLEFF *et al.*, 2007).

A co-dependência da σ^{54} -RNA polimerase com o ativador NifA garante que a regulação transcricional dos genes *nif* seja rigorosa. NifA é um elemento chave na regulação da fixação do nitrogênio e, embora as cascatas regulatórias sejam diferentes entre as espécies bacterianas, cada circuito regulatório culmina na regulação da expressão de NifA ou na modulação de sua atividade em resposta ao oxigênio e/ou nitrogênio fixado (DIXON & KAHN, 2004).

A exemplo de outros EBPs, NifA é formada por três domínios importantes. O domínio central pertencente à superfamília AAA+ de ATPases serve para acoplar a hidrólise de ATP à abertura do promotor σ^{54} . O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice que se liga aos sítios UAS a montante do promotor. O domínio N-terminal da NifA é um domínio sensorial pertencente à família GAF de módulos sinalizadores (MORETT & SEGOVIA, 1993; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2005).

A ativação da transcrição por NifA é regulada em resposta ao oxigênio e nitrogênio fixado. Em muitos membros de diazotróficos dos subgrupos α e β das proteobactérias, a atividade de NifA aparentemente responde ao *status* de oxigênio de forma direta (FISCHER & HENNECKE, 1987), e resíduos de cisteína conservados têm sido implicados nesta resposta (FISCHER *et al.*, 1989). Enquanto que NifA parece ser intrinsecamente sensível ao oxigênio, a sua atividade em resposta à fonte de nitrogênio sofre regulação, sendo que proteínas PII estão envolvidas neste processo. Em alguns organismos fixadores, particularmente em membros do subgrupo γ da Proteobacteria, a atividade de NifA não é intrinsecamente responsiva ao oxigênio e ao nitrogênio intracelular. Outra proteína, NifL, é necessária à modulação da atividade de NifA segundo estes parâmetros. NifL é um anti-ativador que é co-transcrito com a proteína NifA, e regula a função dessa pela formação de um complexo inibitório que impede a atividade ATPásica (SCHMITZ *et al.*, 2002; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004).

Proteínas PII também desempenham papel essencial no controle primário da fixação do nitrogênio em resposta ao nitrogênio fixado, atuando em nível transcricional pela modulação da atividade de NifA. Nos membros da subclasse γ das proteobactérias, o anti-ativador NifL inibe a indução da transcrição dos genes *nif* ao se ligar à NifA, sendo a atividade de NifL regulada por proteínas PII. A situação é diferente para os fixadores de nitrogênio que não possuem o componente NifL. Na maioria destes casos, *nifA* é expresso somente sob limitação de nitrogênio. Não é o caso de *A. brasilense*, em que *nifA* é expresso tanto em condições favoráveis quanto incompatíveis com a fixação do nitrogênio (LIANG *et al.*, 1991). Isso sugere que NifA existe em duas formas, ativa e inativa, dependendo das condições ambientais. Mutantes nulos para *glnB* e mutantes nulos para *glnZ* são prototróficos, mas o mutante para *glnB*, ao contrário do mutante para *glnZ*, é incapaz de fixar nitrogênio. Uma vez que a expressão de *nifA* não é alterada em mutantes para *glnB*, foi sugerido que GlnB participa a modulação de NifA (LIANG *et al.*, 1992).

Formas derivadas de NifA que não possuem o domínio modulador GAF N-terminal apresentam-se ativas mesmo na ausência de GlnB e na presença de amônia. Isso levou à proposta de que GlnB é necessária para a ativação de NifA pela antagonização do efeito inibitório do domínio N-terminal de NifA em condições de fixação (ARSENE *et al.*, 1996). Experimentos de duplo híbrido em levedura demonstraram que GlnB interage diretamente com o domínio GAF N-terminal de NifA de *A. brasilense*, mas não com os domínios central e C-terminal, reforçando esta proposta (CHEN *et al.*, 2005). Já que em condições de fixação GlnB encontra-se uridilada, pode-se inferir que a atuação de GlnB na ativação de NifA acontece neste estado. De fato, mutantes para *glnD* e para uma forma não uridilável de GlnB apresentam fenótipo Nif⁻ (ARSENE *et al.*, 1999; VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). Uma vez que no modelo experimental utilizando levedura GlnB não é uridilada, conclui-se que a forma não uridilada é capaz de se ligar a NifA. Assim, provavelmente a simples ligação de GlnB não é suficiente para ativar NifA em *A. brasilense* (CHEN *et al.*, 2005).

1.6 Alvos celulares de PII em diferentes organismos

De forma resumida, conforme descrito anteriormente, em *E. coli* já foi descrita a participação de PII nos sistemas Ntr de controle transcricional de genes de metabolismo de nitrogênio e no sistema de regulação da atividade da glutamina sintetase. Essa participação foi atribuída às interações GlnB-NtrB e GlnB(UMP)-ATase. Também está bem estabelecida a interação GlnK-AmtB, para a regulação da atividade de transporte de amônia. Essas funções podem estar conservadas em outras bactérias, dada a distribuição dos componentes destes sistemas. Em microrganismos diazotróficos, o número de receptores para PII se estende: GlnB(UMP)-NifA (ou GlnK(UMP)-NifL) para a regulação transcricional de genes *nif* e GlnZ(UMP)-DraG e GlnB(UMP)-DraT para a modificação pós-traducional da nitrogenase. No entanto, devido a notável distribuição de PII entre organismos bastante diferentes - bactérias de todos os tipos, arqueas e cloroplastos de alguns vegetais superiores - já foram descritos diversos outros alvos celulares de PII específicos de cada táxon (LEIGH & DODSWORTH, 2007). A Figura 1.7 traz de forma resumida esses alvos já conhecidos. É interessante ressaltar a diversidade de receptores que PII assume entre diferentes grupos filogenéticos, apesar da sua alta conservação em termos de sequência e estrutura.

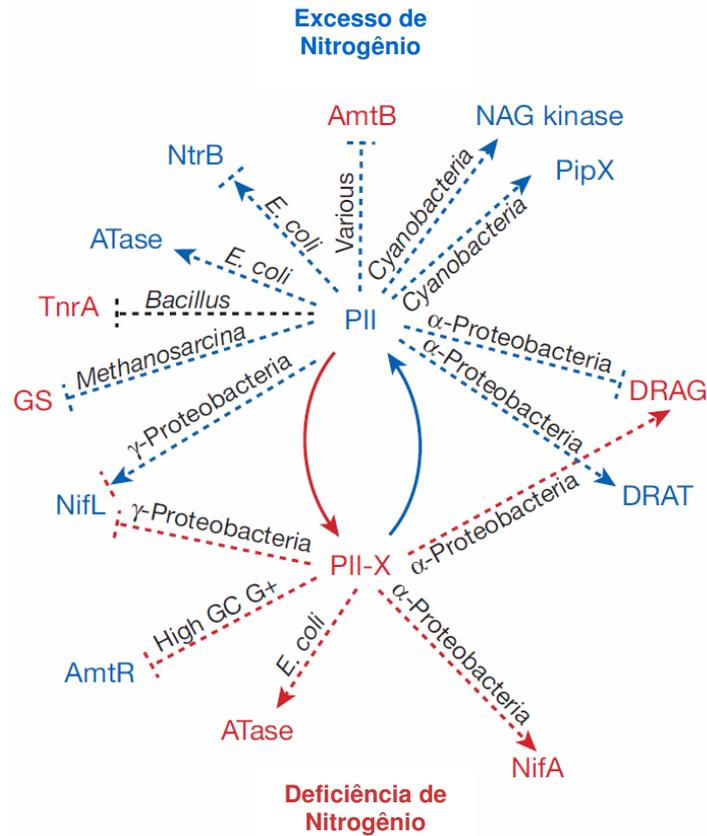


FIGURA 1.7 Alvos de proteínas tipo GlnB e GlnK em vários organismos. PII-X designa formas uridiladas, adeniladas ou fosforiladas de GlnB, GlnK ou proteínas similares. Adaptado de LEIGH & DODSWORTH, 2007.

1.7 O metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum amazonense*

A primeira caracterização dos genes relacionados a fixação do nitrogênio de *A. amazonense* foi realizada por Potrich *et al.* (2001). Nestes estudos foi analisada a presença e organização de diferentes genes relacionados a FBN comparativamente a *A. brasilense*, que é a espécie do gênero melhor caracterizada até o momento, tanto geneticamente quanto fisiologicamente. Nessa comparação, *A. amazonense* revelou ter padrões de organização genômica similares àqueles encontrados em *A. brasilense*. A partir de experimentos de hibridização, sugere-se que os operons *nifHDK*, *nifENX* e *fixABC* e os genes *nifA* e *glnB* de *A. amazonense* podem ser estruturalmente homólogos aos genes correspondentes em *A. brasilense*. Análise de sequência de produtos de PCR revelou similaridades entre a sequência de aminoácidos dos genes altamente conservados *nifD* e *glnB* de *A. amazonense* com os genes correspondentes de *A. brasilense* e de outros diazotróficos. No entanto, as regiões não codificantes de *A.*

amazonense (a região ativadora a montante e a região entre *nifH* e *nifD*) são diferentes das regiões relacionadas de *A. brasilense*, mesmo entre os genes estruturais da nitrogenase (operon *nifHDK*), que são bastante conservados entre as bactérias diazotróficas, sugerindo uma organização gênica diferente entre estas espécies (POTRICH *et al.*, 2001).

No estudo de Potrich *et al.* (2001) foram desenhados *primers* para regiões altamente conservadas da proteína PII GlnB. Estes *primers* foram utilizados para o isolamento de um amplicon de 260 pb relativo ao gene *glnB* de *Azospirillum amazonense*. Posteriormente, este fragmento foi utilizado como sonda em experimentos de hibridização com o DNA genômico de *A. amazonense* digerido com a enzima de restrição Sall. Foram detectados dois sinais de hibridização, sugerindo a existência de pelo menos dois genes para proteínas PII nesta bactéria. Um fragmento correspondente a um dos sinais de hibridização foi isolado e sequenciado. Este fragmento continha o gene *glnK*, parálogo de *glnB*, juntamente com a sua sequência regulatória (SANT'ANNA, 2005).

O restante do gene *glnB* foi isolado através da utilização de técnicas diversas: *Site-Finding PCR*, *GenomeWalker PCR* e PCR inverso. O gene *glnB* de *A. amazonense* segue o padrão de Proteobacteria, sendo flanqueado pelo gene *glnA*, que codifica para glutamina sintetase. No entanto, o gene *glnK* não possui o gene *amtB* nas suas adjacências. A exemplo de *A. brasilense*, o gene *glnK* de *A. amazonense* é seguido de um gene *aat* codificante para uma aspartato aminotransferase. As proteínas GlnB e GlnK de *A. amazonense* apresentam 58% de identidade entre si. Buscas no banco de dados GenBank (NCBI) indicam que GlnB possui maior homologia com GlnB de *Rhodospirillum centenum* SW, apresentando 95% de identidade e 97% de similaridade, embora esses números também sejam expressivos quando comparados com GlnB de *A. brasilense*: 91% de identidade e 97% de similaridade. GlnK apresenta maior similaridade com a proteína tipo GlnK de *A. brasilense*, com identidade de 73% e similaridade de 84%.

A região regulatória dos genes *glnB* e *glnK* de *Azospirillum amazonense* possui consensos característicos de promotores dependentes do fator σ^{54} e de promotores dependentes de σ^{70} (Figura 1.8 A e B). Promotores σ^{54} , classicamente relacionados à transcrição de genes envolvidos com a fixação do nitrogênio, já foram identificados a montante de *glnB* de diversas α -proteobactérias, incluindo *Rhizobium leguminosarum* (ERCOLANO *et al.*, 2001), *Azorhizobium caulinodans* (MICHEL-REYDELLET *et al.*,

1997), *Bradyrhizobium japonicum* (MARTIN *et al.*, 1989) e *Rhodospirillum rubrum* (CHENG *et al.*, 1999). Também foram mapeados sítios UAS para o ativador transcricional NtrC em ambos os genes de *A. amazonense*. Para substanciar essas análises, a influência da oferta de nitrogênio nos níveis de mRNA de *glnB* e de *glnK* foi investigada por experimentos de RT-PCR semi-quantitativo (Figura 1.8C). Os resultados demonstram que ambos os genes têm sua expressão induzida pela escassez de nitrogênio fixado, o que remete à sua importância na adaptação celular a um ambiente pobre neste elemento chave. Podemos concluir que este aumento de expressão provavelmente está relacionado à ativação de promotores dependentes de σ^{54} pelo fator transcricional NtrC. Embora em níveis mais baixos, a expressão de *glnB* e, de forma menos acentuada, *glnK* em presença de NH_4 também foi detectada, indicando uma transcrição basal pelos promotores σ^{70} (Figura 1.8C).

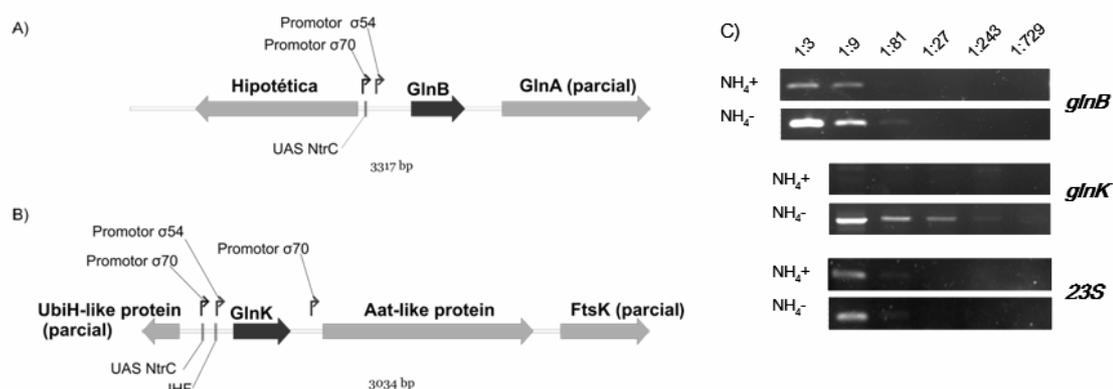


FIGURA 1.8 Genes codificantes para proteínas PII em *A. amazonense*. A) Organização gênica de *glnB*. B) Organização gênica de *glnK*. UAS: *upstream activator sequence* (sequência ativadora a montante, sítio de ligação do ativador transcricional NtrC). IHF: *integration host factor* (fator de integração do hospedeiro). C) RT-PCR semi-quantitativo para os genes *glnB* e *glnK* em diferentes condições de disponibilidade de nitrogênio. São apresentados os produtos obtidos de diferentes diluições de cDNA após 30 ciclos de amplificação. NH_4^+ indica os resultados para RNA extraído de células mantidas por três horas em meio LGI desprovido de fonte de nitrogênio. NH_4^- indica os resultados para RNA extraído de células mantidas em meio LGI acrescido de 50mM de NH_4Cl . Como controle interno são apresentados os produtos obtidos para o gene 23S após 10 ciclos de amplificação (TRENTINI e SANT'ANNA, resultados não publicados).

Devido a semelhança estrutural da proteína GlnB de *A. amazonense* com GlnB de *A. brasilense*, e de GlnK com GlnZ, seria interessante realizar estudos que verificassem se esta semelhança se estende ao nível funcional. A proteína GlnB de *A. brasilense* possui vários alvos celulares bem caracterizados. Por exemplo, GlnB uridilada em resposta a limitação de nitrogênio interage diretamente e ativa o fator transcricional NifA (ARSENE

et al., 1999; ARSENE *et al.*, 1996) assim como a dinitrogenase redutase glicohidrolase ativadora (DraG) (HUERGO *et al.*, 2006b). No entanto, nem GlnB nem GlnZ de *A. brasilense* parecem ser essenciais à modificação pós-traducional da glutamina sintetase (DE ZAMAROCZY M., 1998), em contraste ao que acontece no sistema regulatório global do nitrogênio (Ntr) clássico, caracterizado a partir das enterobactérias.

Devemos ressaltar que a função das proteínas PII depende ainda dos seus diferentes alvos celulares. Por exemplo, não foram encontrados homólogos de *draTG* em *A. amazonense* (FU *et al.*, 1989), o que é consistente com o fato de a ADP-ribosilação da nitrogenase redutase não ter sido detectada *in vivo*. No entanto, a atividade da nitrogenase de *A. amazonense* é parcialmente inibida por NH₄ (HARTMANN *et al.*, 1986). Estes dados indicam que este nível de controle deve ocorrer de forma diferente entre *A. brasilense* e *A. amazonense*. Assim, *A. amazonense* pode apresentar um sistema regulatório diferente de *A. brasilense*, mesmo que o componente central PII seja bastante semelhante entre estas bactérias (TRENTINI, 2007).

2. OBJETIVOS

Estudos em nosso laboratório vêm buscando caracterizar os sistemas regulatórios do metabolismo da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense*, pois esta apresenta características peculiares dentro do gênero *Azospirillum*. Esse grupo é bastante estudado em função de suas características economicamente interessantes de promoção do crescimento vegetal e pela sua notável versatilidade metabólica, que inclui a capacidade de fixar nitrogênio em vida livre.

O presente trabalho tem como objetivo primário realizar análises iniciais do metabolismo de nitrogênio em *A. amazonense* tomando como ponto inicial o estudo da função das proteínas regulatórias PII. Estas proteínas foram selecionadas por representarem um componente central de regulação de diversas vias metabólicas, servindo como unidade processadora de diferentes estímulos, como níveis de nitrogênio, carbono e energia. A impressionante distribuição e conservação de PII entre bactérias e arqueas faz ainda com que este estudo seja útil para o estabelecimento de correlações com os sistemas regulatórios de outras espécies.

Os objetivos específicos deste trabalho são buscar os alvos celulares das proteínas GlnB e GlnK de *A. amazonense* sob as principais condições de atuação de PII: abundância e privação de nitrogênio. Portanto, foi selecionado o sistema de *pull-down* para a identificação das suas proteínas de interação. Por fim, deseja-se avaliar qual o efeito de ATP e 2OG sob as interações descritas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Métodos básicos em biologia molecular

Isolamento de DNA plasmidial, eletroforese em gel de agarose e SDS-PAGE (protocolo Laemmli), transformação bacteriana por eletroporação e seleção de transformantes foram conduzidos como descrito por Russell e Sambrook (2001). DNA e RNA em gel de agarose foram visualizados pelo reagente brometo de etídeo, enquanto que proteínas em gel de SDS-PAGE foram coradas por Coomassie coloidal, como descrito (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Clonagens foram feitas *in vitro* utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fermentas), conforme instruções do fabricante, sendo transformadas em *Escherichia coli* XL1 Blue (Invitrogen) para seleção de clones. Enzimas de restrição foram obtidas por meios comerciais e usadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Quantificações de DNA e RNA foram feitas em fluorômetro Qubit (Invitrogen) utilizando os kits comerciais Quant-iT™ dsDNA (BR ou HS) e Quant-iT™ RNA, respectivamente.

Purificações de DNA foram feitas com uso do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). RNA foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), tratado com RQ1 DNase (Promega), segundo orientações dos fabricantes, e purificado pelo método fenol/clorofórmio (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Para a síntese de cDNA, foram utilizados 500 ng de RNA, 100 ng de *primers* randômicos, 25 U de inibidor de RNase *RNAGuard* (GE Healthcare) e 200 U da transcriptase reversa M-MLV RT (Invitrogen). A reação foi feita com base no protocolo fornecido pelo fabricante. Reações de PCR foram feitas utilizando 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 30 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase em tampão 1X do fabricante da polimerase utilizada. Sequenciamento de DNA foi realizado pelo método automático no aparelho MEGABACE (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

3.2 Clonagem e expressão heteróloga de GlnB de *A. amazonense*

O gene *glnB* de *A. amazonense* foi amplificado por PCR utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) a partir dos primers GlnB-HIS-PET Fw e Rev (Tabela 3.1) que contêm, respectivamente, sítios de restrição para as

enzimas NcoI e XhoI. Estes sítios foram utilizados para a clonagem no vetor de expressão pET23d(+) (Novagen). A clonagem foi verificada por PCR utilizando os mesmos primers e a enzima Taq DNA Polimerase (Cenbiot^{Enzimas}). Clones positivos foram sequenciados para a confirmação da integridade da sequência gênica de *glnB*, novamente utilizando os mesmos primers.

O vetor pET23d-GlnB6His expressa a proteína GlnB fusionada a uma cauda de 6 histidinas na posição carboxi-terminal. A expressão de GlnB foi realizada na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen). Uma unidade formadora de colônia resultante de transformação recente foi inoculada em 3 mL de meio Luria Bertani (LB) líquido acrescido de 100 µM do antibiótico ampicilina e glicose 1 %, que foi mantido a 37°C sob agitação orbital por cerca de 16 horas. Esta cultura foi diluída na razão 1:100 em 1 L de meio idêntico e mantida a 37°C e agitação orbital até atingir fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ 0.4-0.6). A expressão de GlnB foi então induzida pela adição de 1 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Fermentas), sendo a cultura então mantida a 37°C sob agitação orbital por 3 horas. Após esse tempo, as células foram coletadas por centrifugação (10.000g, 10 min) e congeladas a -20°C até a extração proteica. A presença de uma banda de tamanho correspondente à GlnB diferencialmente expressa antes e depois da adição de IPTG foi analisada por SDS-PAGE.

3.3 Clonagem e expressão heteróloga de GlnK de *A. amazonense*

O gene *glnK* de *A. amazonense* foi amplificado por PCR utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) a partir dos primers GlnK-NdeI Fw e GlnK-BamHI Rev (Tabela 3.1), que contêm os sítios de restrição indicados. Estes sítios foram utilizados para a clonagem no vetor pET28a(+) (Novagen). Procedeu-se com a obtenção e análise de clones de forma semelhante à feita para o gene *glnB*.

O vetor pET28a-6HisGlnK expressa a proteína GlnK fusionada a uma cauda de 6 histidinas na posição amino-terminal. A linhagem de *E. coli* utilizada para expressão de GlnK foi BL21 (DE3) Star (Invitrogen). Uma unidade formadora de colônia resultante de transformação recente foi inoculada em 25 mL de meio LB líquido acrescido de 30 µM do antibiótico canamicina e glicose 1 %, que foi mantido a 25°C sob agitação orbital por cerca de 16 horas. As células foram então coletadas por centrifugação (2.500 g, 5 min) e inoculadas em 1 L de meio idêntico, colocado a 25°C e

agitação orbital até atingir fase exponencial de crescimento (DO_{600} 0.4-0.6). A expressão de GlnK foi então induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG (Fermentas), sendo a cultura então mantida a 25°C sob agitação orbital por 3 horas. Após esse tempo, as células foram coletadas por centrifugação (10.000g, 10 min) e congeladas a -20°C até a extração proteica. A presença de uma banda de tamanho correspondente à GlnK diferencialmente expressa antes e depois da adição de IPTG foi analisada por SDS-PAGE.

3.4 Extração das proteínas recombinantes

As células de *E. coli* contendo GlnB ou GlnK, resultantes de 1 L de cultura, foram resuspendidas em 40 mL de tampão de ligação apropriado e congeladas e descongeladas por 3 vezes (3 ciclos de -20°C/temperatura ambiente). Após, foram submetidas a 5-8 pulsos de 30 segundos de sonicação (amplitude próxima a 40, 70-80 Watts), no gelo e com intervalos de 1 minuto até a clarificação do extrato, em aparelho VibraCell (Sonics & Material). A fração insolúvel foi separada por centrifugação (10.000g, 30min). Para a total eliminação de matéria insolúvel, os sobrenadantes foram filtrados em filtros de celulose de poro 0,45 μ m (Millipore). A presença de GlnB ou GlnK no sobrenadante foi avaliada por gel de SDS-PAGE.

3.5 Purificação de GlnB por cromatografia de afinidade por níquel

Aproximadamente de 1 mL de resina carregada com níquel HisLink (Promega) foi empacotada em coluna por gravidade e equilibrada em tampão de ligação B (100 mM de HEPES pH 7,5, 300 mM de NaCl e 10 mM de imidazol). O extrato solúvel de *E. coli* contendo GlnB recombinante, preparado em tampão de ligação B, foi então aplicado à coluna. Em seguida, esta foi lavada para a remoção de proteínas não ligadas com 20 volumes de tampão de lavagem B (100 mM de HEPES pH 7,5, 300 mM de NaCl e 20 mM de imidazol). A eluição da proteína GlnB foi realizada gradualmente com 7 frações de 5 volumes de tampão de eluição B (100 mM de HEPES pH 7,5) contendo concentrações crescentes de imidazol (25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 mM). Os eluatos obtidos foram analisados por SDS-PAGE. A proteína GlnB apresentou-se na

forma pura nas frações contendo 500 e 1000 mM de imidazol. O tampão dessas amostras foi trocado para tampão 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, com o uso do dispositivo de ultrafiltração de membrana de celulose (corte de 3 kDa) Amicon Ultra-15 (Millipore), através de diversos ciclos de concentração das proteínas e diluição no tampão desejado, segundo orientações do fabricante. As proteínas purificadas foram estocadas a -70°C nesse tampão acrescido de 50% de glicerol.

3.6 Purificação de GlnK por cromatografia de afinidade por níquel

Aproximadamente 1 mL de resina carregada com níquel HisLink (Promega) foi empacotada em coluna por gravidade e equilibrada em tampão de ligação K (50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM de imidazol, 1 mM DTT e 10% (v/v) glicerol). O extrato solúvel de *E. coli* contendo GlnK recombinante, preparado em tampão de ligação K, foi então aplicado à coluna. A resina foi lavada com 50 volumes de tampão de lavagem K (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,5, 500 mM NaCl, 50 mM de imidazol, 10% glicerol, 0,1% Tween 20, 10 mM β-mercaptoetanol e 1 mM de DTT) para a remoção de proteínas não ligadas e interrupção de possíveis agregados proteicos. A eluição da proteína GlnK foi realizada com 4 frações de 5 volumes de tampão de eluição K (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT e 10% de glicerol) contendo concentrações crescentes de imidazol (125, 250, 500 e 1000 mM). As frações referentes a 500 e 1000 mM de imidazol foram imediatamente dialisadas em membrana de celulose regenerada Spectra/Por MWCO 12-14 kDa (Spectrum) em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 300 mM NaCl, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT e 10% de glicerol a 4°C por 24h. A pureza dessas frações foi analisada por SDS-PAGE. A proteína GlnK parcialmente purificada foi estocada no tampão de diálise a -20°C por curto período.

3.7 Preparo dos extratos proteicos de *A. amazonense* referentes a condições de abundância e privação de nitrogênio

Uma unidade formadora de colônia de *A. amazonense* (linhagem Y2, ATCC 35120) foi inoculada em 3 mL de meio M79 (FRED & WAKSMAN, 1928) por 24h, sendo após diluída na razão 1:1000 em 1 L do mesmo meio. Este foi incubado a 35°C por de 16h, até atingir fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ próxima a 0,5). A cultura foi então dividida em duas partes iguais. As células de cada parte foram coletadas por centrifugação (5.000 g, 12min) e lavadas duas vezes com 150 mL de meio mínimo LGI (DÖBEREINER *et al.*, 1995) contendo ou não fonte de nitrogênio (50 mM NH₄Cl). Cada fração foi então resuspendida em 600 mL do respectivo meio LGI de forma a atingir diluição correspondente a DO₆₀₀ de 0,4. A fração contendo 50 mM NH₄Cl foi mantida a 35°C sob agitação orbital, enquanto que a fração sem fonte de nitrogênio foi mantida a 35°C sem agitação. Após 3h as células foram coletadas por centrifugação (5.000g, 12 min) e congeladas a -20°C até a extração de proteínas.

Para confirmar o efeito do tratamento, foi realizado um experimento de RT-PCR semi-quantitativo analisando a expressão do gene *glnK* como indicativo da resposta à falta de nitrogênio, a partir da extração de RNA de uma alíquota de cada fração de células de *A. amazonense* tratadas. Para o RT-PCR, uma diluição de 1:8 de cDNA foi utilizada em reação de PCR padrão (30 ciclos) com a enzima GoTaq DNA Polimerase (Promega), utilizando os primers GlnK-NdeI-Fw e GlnK-BamHI-Rev. Como controle de normalização do cDNA, foi feito um RT-PCR para o rRNA 23S com os primers 23S up e 23S do (Tabela 3.1), a partir de diluições de cDNA de 1:20 e 1:30, com 18 ciclos de amplificação.

Para a extração de proteínas, cada fração foi resuspendida em 5 mL de tampão 100 mM HEPES pH 7,5, 1 mM DTT e submetida a 3 ciclos de congelamento/descongelamento a -20°C/temperatura ambiente. Após, foram submetidas a 8 pulsos de sonicação de 30 segundos (amplitude 40, 70-90 Watts), no gelo com 1 minuto de intervalo, em aparelho VibraCell (Sonics & Materials). Para a remoção de material insolúvel os extratos foram centrifugados a 10.000 g por 1h e filtrados em membrana PSU (Whatmann) 0,45 µm. A concentração proteica foi estimada pelo método de Bradford com uso do *kit* comercial Bio-Rad Protein Assay. Proteínas foram estocadas em alíquotas de uso a -70°C.

3.8 Metodologia de *pull-down*

O protocolo de *pull-down* foi desenvolvido conforme recomendações feitas por Markillie *et al.* (2004). Para o experimento de *pull-down*, primeiramente quantificou-se a proteína isca (GlnB ou GlnK) em fluorômetro Qubit (Invitrogen) com uso do *kit* Quant-iT™ Protein (Invitrogen). Quantidade adequada de contas magnéticas carregadas com níquel (MagneHis, Promega) foi lavada 3 vezes no mesmo tampão da proteína isca, com auxílio de uma estante magnética. A proteína isca foi então incubada com as contas magnéticas por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação. O sobrenadante contendo as proteínas excedentes não ligadas foi coletado e quantificado novamente. Considerou-se que a diferença da primeira e da segunda quantificação representa a quantidade de proteínas ligadas às contas magnéticas. Em experimentos com a proteína 6HisGlnK procedeu-se com 10 lavagens das contas magnéticas com 1 mL de tampão de lavagem K. A concentração de proteínas ligadas foi ajustada para 1 µg/µL com tampão de ligação da proteína isca. Quantidade definida (na faixa de 10 a 60 µg) de proteína isca imobilizada nas contas foi incubada com 1 mL de extrato proteico de *A. amazonense* na concentração 5 mg/mL a 4°C por 1h sob agitação. Posteriormente, as contas magnéticas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de tampão HEPES 100 mM pH 7,5. A proteína isca e suas proteínas de interação foram desligadas das contas magnéticas através de fervura das contas em tampão de amostra de SDS-PAGE 4X (protocolo Laemmli, SAMBROOK & RUSSELL, 2001) por 5 minutos. As amostras puderam então ser diretamente aplicadas em gel de SDS-PAGE 17%.

3.9 Preparo das amostras para LC-MS/MS

As bandas de interesse em gel de SDS-PAGE foram tripsinizadas *in gel* para posterior análise por espectrometria de massas em tandem. Para um melhor rendimento da digestão por tripsina, as proteínas foram previamente desnaturadas, através da redução das pontes dissulfeto e alquilação dos resíduos de cisteína, de forma a expor sítios de hidrólise inacessíveis sob condições nativas. O protocolo otimizado para ionização em *electrospray*, encontra-se disponível em anexo. De forma resumida, bandas de interesse foram cortadas dos géis de SDS-PAGE em cubos de 1 mm³ e o corante Coomassie coloidal foi removido por três lavagens com solução de 50 mM

NH₄HCO₃ pH 8/acetonitrila 50%. As proteínas imobilizadas nos géis foram reduzidas com 10 mM de ditioneitol (DTT) em NH₄HCO₃ 50 mM pH 8 a 56°C por 1h e logo após alquiladas com 55 mM de iodoacetamida em 50 mM NH₄HCO₃ pH 8 a temperatura ambiente, no escuro, por 45 minutos. Foram então lavadas duas vezes, primeiramente com 50 mM NH₄HCO₃ pH 8, e após com 50 mM NH₄HCO₃ pH 8/acetonitrila 50%. Géis foram então desidratados com acetonitrila 100% e secos em aparelho MiVac (GeneVac) a 45°C sob vácuo. A reidratação deu-se com uma solução de 10 ng/μL de tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) em 50 mM de NH₄HCO₃ pH 8. Procedeu-se a reação de tripsinização por 16h a 37°C. Fragmentos tripticos foram então extraídos do gel duas vezes com solução de 5% de ácido fórmico/50% de acetonitrila. Essa extração foi seca no aparelho MiVac (GeneVac) a 45°C sob vácuo e resuspendida em 10 μL de ácido fórmico 1%.

3.10 Identificação das proteínas por espectrometria de massas em tandem

A identificação das proteínas foi realizada pelo método de LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem), nos aparelhos nanoAcquity *Ultra Performance Liquid Chromatography* (Waters) e Micromass QToF Micro (Waters), da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS. O processamento dos dados brutos e a identificação das proteínas foram feitos no programa Mascot (Matrix Science). Para a identificação das proteínas foi implementado um banco de dados local a partir de um sequenciamento parcial do genoma de *A. amazonense* Y2, realizado no Laboratório Nacional de Computação Científica, contendo 1.565 contigs e 7.083.200 pb no total. Isso representaria aproximadamente 97% de cobertura considerando a estimativa experimental de 7,3 mpb para o tamanho total do genoma de *A. amazonense* (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000). Para o banco de dados, todas as fases abertas de leitura maiores que 100 pb foram marcadas, traduzidas e extraídas no programa Artemis 11 (Sanger Institute). Quando havia uma metionina no início das sequências, os aminoácidos precedentes a esta foram removidos (função *Trim sequences to met*, pacote Artemis 11). Para a busca no programa Mascot foram utilizados os seguintes parâmetros: enzima tripsina com até 1 clivagem perdida, carbamidometilação como

modificação fixa, oxidação de metionina como modificação variável, tolerância para peptídeos de 1,6 Da, tolerância para MS/MS de 0,6 Da, carga de peptídeos +1, +2 e +3 e instrumento ESI-QUAD-TOF.

3.11 Anotação de sequências

Para a anotação de sequências, buscou-se proteínas homólogas às proteínas identificadas nos experimentos no banco de dados *nr* (não redundante) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) proteína/proteína. Também se levou em consideração a presença de domínios conservados - de diversos tipos, como sítios funcionais, padrões, perfis, matrizes, assinaturas de famílias - descritos nos bancos de dados Conserved Domain Database (CDD, National Center for Biotechnology Information - NCBI) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2009; MARCHLER-BAUER & BRYANT, 2004), PROSITE (Swiss Institute of Bioinformatics) (HULO *et al.*, 2008) e Pfam (Wellcome Trust Sanger Institute) (FINN *et al.*, 2010), utilizando as ferramentas de busca dos respectivos servidores.

TABELA 3.1 Primers utilizados neste estudo

Primer	Sequência	Tamanho	Ta ^a	Sítio de restrição ^b
GlnB-HIS-PET Fw	5' cctagccatggatgaaaaagatcgaag	27 pb	55 °C	NcoI
GlnB-HIS-PET Rev	5' aaccgctcgaggacggcgctccgg	23 pb	55 °C	XhoI
GlnK-NdeI Fw	5' ggactacatatgaagctcgtggtgg	25 pb	60 °C	NdeI
GlnK-BamHI Rev	5' gccttatgaggatcccgtgacg	22 pb	60 °C	BamHI
23S up	5' gctgagggtgggtaaacac	19 pb	60 °C	-
23S do	5' aatcatccgacgctctacct	20 pb	60 °C	-

^aTa: Temperatura de anelamento utilizada nos experimentos de PCR.

^bSítio de restrição presente no primer, conforme sublinhado na sequência.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão heteróloga e purificação de GlnB e GlnK recombinantes

Tendo em vista o objetivo de investigar as proteínas de interação de GlnB e GlnK de *A. amazonense*, escolhemos fusionar essas proteínas a uma cauda de 6 histidinas, o que permite a sua imobilização em colunas cromatográficas de níquel. Estas seriam úteis tanto para experimentos de purificação como para experimentos de isolamento de proteínas de interação pela técnica de *pull-down*. O tamanho pequeno desse peptídeo, quando comparado a outros sistemas de fusão, como glutationa-S-transferase, seria vantajoso por representar menor impedimento estérico para a trimerização e para a interação das proteínas de interesse com os seus receptores celulares.

Os genes codificantes das proteínas GlnB e GlnK de *A. amazonense* foram clonadas em vetor pET23d(+) (mapa em anexo, Figuras 8.1 e 8.2), nos sítios NcoI e XhoI, o que resulta na inserção de uma cauda de histidina carboxi-terminal. A partir desse, a proteína GlnB foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) Star em alta quantidade e na forma solúvel, podendo ser purificada em coluna de afinidade por níquel (Figura 4.1). No entanto, GlnK não apresentou uma expressão detectável em gel de SDS-PAGE após 3h de indução com 0,5mM de IPTG para as diversas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) testadas: Star (Invitrogen), Rosetta (Novagen), RIL (Stratagene), RP (Stratagene), C43 (MIROUX & WALKER, 1996) e pT-GroE (YASUKAWA *et al.*, 1995) (Figura 4.2).

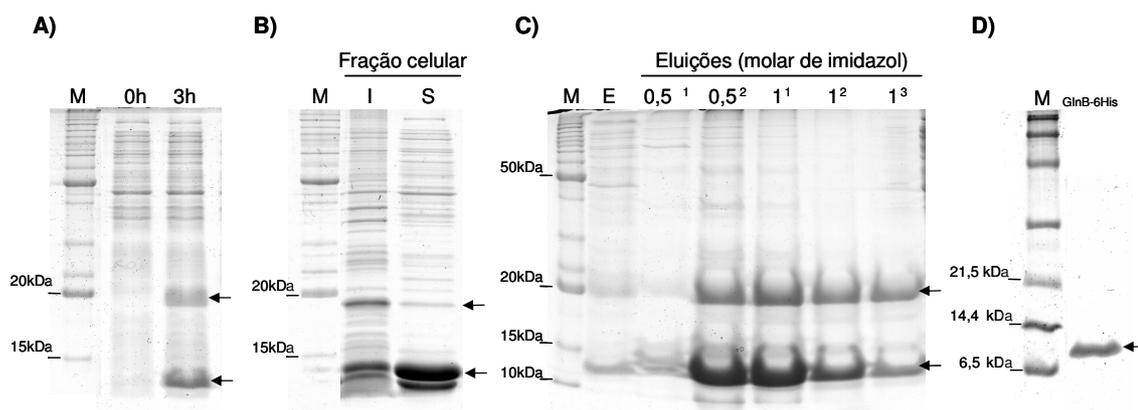


FIGURA 4.1 Expressão e purificação de GlnB de *A. amazonense*. **A)** Expressão de GlnB6His a partir do vetor pET23d-GlnB6His em *E. coli* BL21 Star a 37°C antes (0h) e após 3h de indução com 1mM de IPTG. **B)** Análise da solubilidade em *E. coli* da proteína GlnB6His recombinante. São apresentadas as frações celulares insolúel (I) e solúvel (S), separadas por centrifugação. **C)** Purificação de GlnB-6His por cromatografia de afinidade por níquel, utilizando a resina HisLinK (Promega). São apresentados o extrato de *E. coli* expressando GlnB6His (E) e as eluições contendo 0,5 ou 1M de imidazol. Números sobrescritos indicam a fração de eluição (primeiro, segundo ou terceiro mL obtidos). Note que a proteína GlnB apresenta forte tendência de apresentar também dímeros em SDS-PAGE. **D)** GlnB6His purificada em gel de SDS-PAGE 17% contendo concentração maior de β -mercaptoetanol no tampão de amostra, apresentando apenas uma banda correspondente a massa molecular esperada (13,5 kDa). Setas indicam prováveis bandas correspondentes à proteína GlnB. M: marcador de peso molecular.

A ausência de expressão de GlnK poderia ser atribuída a diversas causas, entre elas a instabilidade do vetor ou a instabilidade (e degradação) de GlnK. A proteína GlnK de *A. amazonense* é bastante similar à de *E. coli* (59% de identidade e 79% de similaridade). Em *E. coli*, GlnK é expressa apenas sob condições de privação de nitrogênio, ao contrário de GlnB, que é constitutiva. A superexpressão de uma GlnK poderia estar alterando as vias de sinalização do metabolismo de nitrogênio, criando um efeito tóxico. Para analisar estas possibilidades, realizou-se um experimento expressão de GlnK em BL21 (DE3) Star a partir de várias concentrações de IPTG (0,1; 0,2; 0,4 e 1mM), monitorando-se a expressão nos tempos 30 min, 1, 2 e 3h. Não foi detectada expressão em nenhuma destas condições (dados não mostrados). Segundo a literatura, algumas proteínas instáveis apresentam expressão após pouco tempo de indução, não sendo posteriormente detectadas devido à degradação. Também existem relatos sobre algumas proteínas tóxicas que podem ser expressas, em níveis baixos, sob condições brandas de indução. Nenhum destes cenários se aplicou a expressão de GlnK.

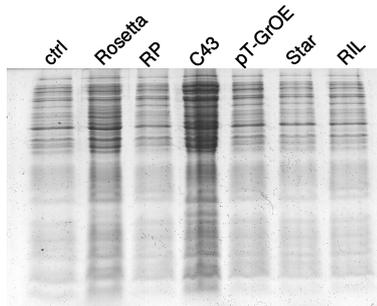


FIGURA 4.2 Expressão de GlnK-6His em diferentes linhagens de *E. coli* BL21 (DE3). Gel de SDS-PAGE 17% apresentando os extratos proteicos após 3h de indução com 0,5 mM de IPTG a 37°C. ctrl denota linhagem não induzida. Não foi detectada uma banda de expressão diferencial entre linhagens induzidas e não induzidas.

Análise pelo programa *E. coli Codon Usage Analysis 2.0* revelou que GlnK apresenta uma quantidade maior de codons raros em *E. coli* comparativamente a GlnB (15 códons de frequência menor que 10% para o determinado aminoácido em GlnK, contra 5 em GlnB). No entanto, diferentes linhagens de *E. coli* com suplementação de tRNAs para codons raros foram testadas sem sucesso: Rosetta, RP (para genomas GC ricos, como de *Azospirillum*) e RIL (para genomas AT ricos) (Figura 4.2). Porém, nenhuma destas linhagens suplementa o códon CGG (8% de frequência entre os códons para Arginina), que está presente 5 vezes em GlnK, nem para o códon TTG (11% de frequência para Leucina), que aparece 3 vezes. Além disso, para a clonagem de *glnK*, foi inserido um sítio de NcoI no *primer* referente à porção 5', o que resultou na troca do segundo aminoácido de GlnK de lisina para ácido glutâmico. Isso poderia resultar na instabilidade da proteína. No entanto, considerando a regra do N-terminal para *E. coli*, que relaciona a meia vida da proteína ao resíduo N-terminal, essa troca seria favorável para a estabilidade da proteína (TOBIAS *et al.*, 1991). Tobias *et al.* (1991) demonstraram que, em *E. coli*, proteínas contendo uma lisina na segunda posição possuem uma meia vida de cerca de 2 minutos, enquanto que em proteínas contendo ácido glutâmico esse tempo sobe para mais de 10h (TOBIAS *et al.*, 1991).

Seguindo a hipótese de que a ausência de expressão seria resultado de instabilidade do vetor de expressão ou toxicidade da proteína, o gene *glnK* foi clonado no vetor pET28a(+) (mapa em anexo, Figuras 8.3 e 8.4) nos sítios NcoI e XhoI, o que resulta em uma GlnK fusionada a uma cauda de histidina carboxi-terminal, idêntica a expressa por pET23d(+). As principais diferenças entre estes dois vetores são o gene de resistência a antibióticos - ampicilina em pET23d e canamicina em pET28a - e a presença de um operador *lac* acoplado ao promotor T7 (para a expressão da proteína de interesse) em pET28a. A seleção por ampicilina tende a ser perdida em culturas com o tempo, devido à β -lactamase secretada no meio e à queda no pH em função do metabolismo bacteriano, que levam à degradação do antibiótico. Assim, a resistência a

canamicina seria preferível para uma melhor manutenção dos plasmídeos em *E. coli*. A presença de um operador *lac* no promotor T7 aumenta a estringência de regulação da expressão da proteína de interesse, evitando o vazamento de expressão durante condições de não-indução, o que é especialmente importante para proteínas tóxicas.

O vetor pET28a-GlnK6His(NcoI/XhoI) apresentou expressão de GlnK detectável por SDS-PAGE em BL21 (DE3) Star, porém em níveis bastante baixos (Figura 4.3). Essa expressão se manteve baixa em diferentes concentrações de IPTG (0,5 ou 1mM), em diferentes tempos de indução (1, 2 e 3h) e em diferentes temperaturas (37, 28 e 25°C) (Figura 4.3 A-C). Outras linhagens de *E. coli* BL21 DE3, como C43, RP e JM109 (Promega), não apresentaram expressão (dados não mostrados). No entanto, mesmo em níveis baixos, GlnK expressa a 37°C em *E. coli* Star se apresentou insolúvel (Figura 4.3D).

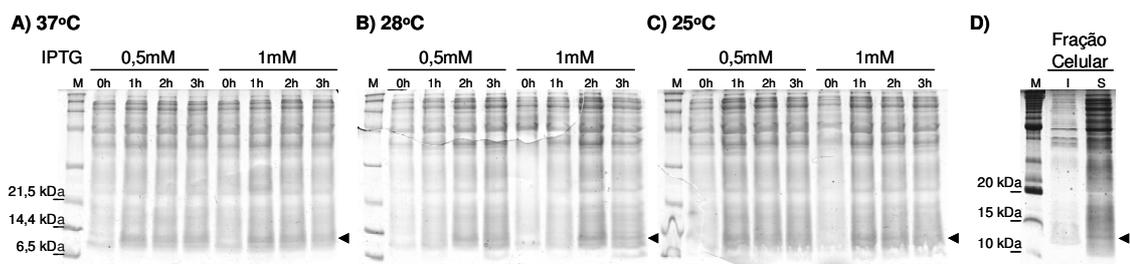


FIGURA 4.3 Expressão de GlnK6His a partir de pET28a-GlnK6His (NcoI/XhoI). Géis de SDS-PAGE 17% mostrando a expressão em *E. coli* BL21 (DE3) Star em três temperaturas diferentes: 37°C (A), 28°C (B) e 25°C (C). São mostrados os resultados obtidos para 0, 1, 2 ou 3 horas após a adição de 0,5 ou 1mM de IPTG. D) Teste de solubilidade de GlnK6His expressa a 37°C, 1mM de IPTG por 3h, mostrando as frações insolúvel (I) e solúvel (S), separadas por centrifugação. Setas indicam a banda correspondente a GlnK6His. M: marcador de peso molecular.

Devido aos resultados obtidos com a expressão de GlnK, foi testada então a mesma construção feita para GlnZ de *A. brasilense*, que emprega os sítios NdeI e BamHI de pET28a para conferir cauda de histidina amino-terminal. Essa cauda é mais longa (Met-Gly-Ser-Ser-**His-His-His-His-His-His**-Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His), possuindo um sítio de clivagem para trombina (sublinhado). Nessa construção não foi necessário modificar o segundo aminoácido de GlnK. O vetor resultante apresentou bons níveis de expressão a 37°C com 0,5mM de IPTG por 1 e 3h em diversas linhagens de BL21 DE: Star, RIL, RP, pT-Trx, pT-GroE (YASUKAWA *et al.*, 1995) (Figura 4.4 A e B). Interessantemente, as linhagens C41 e C43, que são mutantes

espontâneos isolados devido a produção aumentada de proteínas tóxicas, não expressaram GlnK (Figura 4.4A).

Para todas as linhagens em que GlnK foi expressa a 37°C, esta apresentou-se na forma insolúvel (Figura 4.4C). Visando taxas menores de expressão, de forma a aumentar a solubilidade da proteína, testou-se a expressão a 25°C com as concentrações 0,1mM e 0,5mM de IPTG em todas as linhagens que expressaram GlnK. A expressão de GlnK com 0,1mM de IPTG foi muito menor do que a com 0,5mM (Figura 4.4D). Independente disso, para as linhagens pT-Trx e pT-GroE, GlnK se mostrou insolúvel, enquanto que para Star e RP a proteína se mostrou parcialmente solúvel (Figura 4.4 E e F). Decidimos então purificar a proteína GlnK a a partir de expressão em BL21 (DE) Star, 25°C e 0,5mM de IPTG.

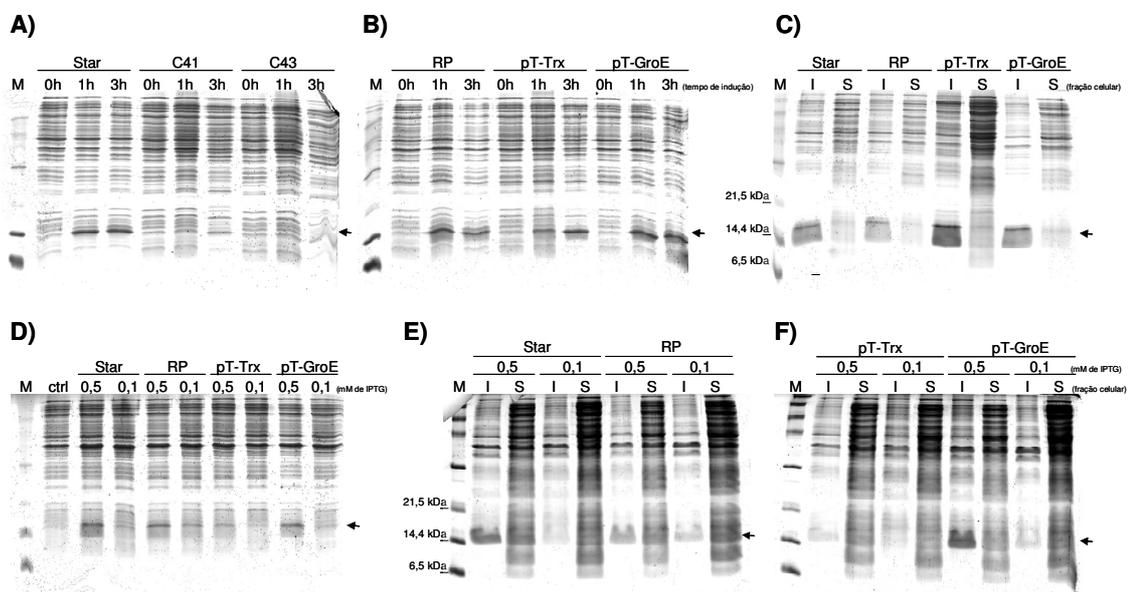


FIGURA 4.4 Expressão de 6HisGlnK a partir de pET28a-6HisGlnK (NdeI/BamHI). Géis de SDS-PAGE 17% apresentando: **A)** e **B)** Expressão de 6HisGlnK a 37°C antes (0h) e após 1 e 3h da adição de 0,5mM de IPTG nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) indicadas. **C)** Teste de solubilidade das expressões referentes a 3h apresentadas em A e B. I e S indicam fração celular insolúvel e solúvel, respectivamente. **D)** Expressão de 6HisGlnK a 25°C após 3h da adição de 0,1 ou 0,5mM de IPTG nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) indicadas. ctrl indica linhagem não induzida. **E)** e **F)** Teste de solubilidade das expressões apresentadas em D. Setas indicam a banda correspondente a 6HisGlnK, cuja massa molecular aproximada seria 14,2 kDa. M: marcador de peso molecular.

Não foi possível obter a mesma qualidade de purificação atingida para GlnB nas cromatografias de GlnK. Esta sempre apresentou uma série de proteínas contaminantes em todos os experimentos realizados. Duas resinas de níquel foram testadas: Ni-NTA Agarose (Qiagen) e HisLinK (Promega), seguindo as instruções de cada fabricante. Não houve melhora no grau de purificação das frações mais puras de GlnK quando re-

submetidas a novo experimento de cromatografia em resina Ni-NTA Agarose (Figura 4.5). Também foi testada a purificação pelas contas magnéticas de níquel MagneHis (Promega), que haviam apresentado resultados excelentes para GlnB, mas que mantiveram várias proteínas contaminantes para GlnK. A resina HisLink pareceu produzir resultados melhores do que os obtidos com a resina Ni-NTA Agarose (Figura 4.5). Portanto, a purificação parcial de GlnK foi realizada em resina HisLink a partir de um protocolo otimizado para a disrupção de agregados proteicos e eliminação de contaminantes.

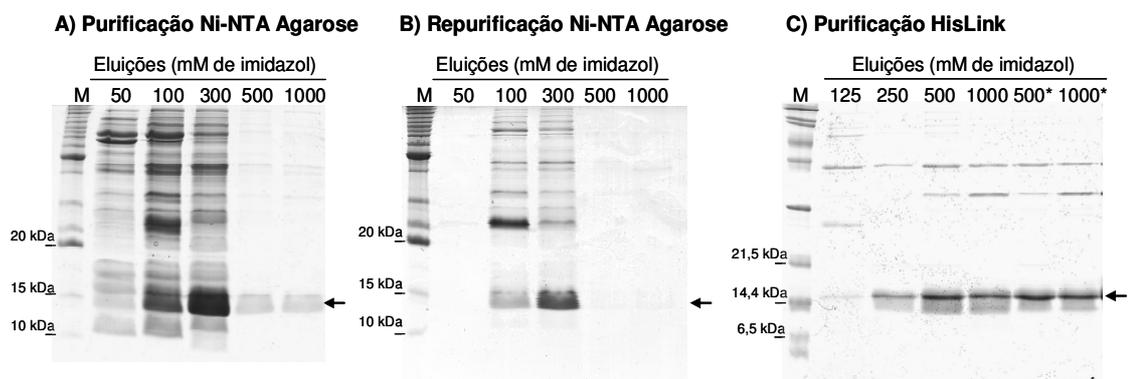


FIGURA 4.5 Purificação de 6HisGlnK por cromatografia de afinidade por níquel. Géis de SDS-PAGE 17% apresentando as eluições obtidas para diferentes concentrações de imidazol. **A)** purificação utilizando a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). **B)** Repurificação das eluições 500 e 1000 mM apresentadas em (A), utilizando novamente a resina Ni-NTA Agarose. **C)** Purificação utilizando a resina HisLink (Promega). * marcam as frações de eluição após a troca do tampão por diálise. Setas indicam as prováveis bandas correspondentes à 6HisGlnK.

A proteína GlnK parcialmente purificada apresentou-se altamente instável. Congelamento a -20°C das frações obtidas na cromatografia de afinidade por níquel resultou na precipitação de GlnK (mas não das proteínas contaminantes). O problema foi resolvido pelo acréscimo de glicerol 50% nas frações antes da estocagem a -20°C . No entanto, durante a troca do tampão de eluição para o tampão TrisHCl 50mM, KCl 100mM pH 7,5 - comumente utilizado na literatura para experimentos de caracterização de PII - com o uso de dispositivos de ultra-filtração AMICON, a proteína também precipitou, adquirindo a cor laranja. Para otimização da estabilidade da proteína, foi utilizado então um tampão de alta concentração iônica contendo aditivos em concentrações baixas que desfavoreceriam agregação proteica. O pH foi alterado para 8,5 - mais distante do ponto isoelétrico de 6HisGlnK - que teoricamente seria 7,11. A presença de DTT 1mM e a manutenção de concentrações baixas de proteína se mostraram fatores importantes para a solubilidade de GlnK. Assim, após novo

experimento de purificação, GlnK foi imediatamente dialisada no tampão modificado. Embora não tenha formado um precipitado, a solução contendo GlnK dialisada adquiriu leve coloração amarela.

4.2 Pull-down de GlnB e GlnK deuridiladas com extrato proteico de *A. amazonense* referente à condição de abundância de nitrogênio fixado.

Com o objetivo de identificar as proteínas que estabelecem interação com GlnB ou GlnK não modificadas sob condições de suficiência de nitrogênio, foram realizados experimentos de *pull-down* das proteínas purificadas utilizando extrato proteico de *A. amazonense* cultivado em meio rico em fonte de nitrogênio. A Figura 4.6 apresenta géis de SDS-PAGE 17% corados com Coomassie coloidal demonstrando os resultados obtidos com GlnB6His purificada em dois experimentos independentes. As prováveis proteínas de interação foram cortadas do gel e submetidas à identificação por LC-MS/MS. As identificações significativas e com *score* acima de 40 estão apresentadas na Figura 4.6, juntamente com a massa molecular teórica de cada proteína identificada. A Tabela 4.1 traz os detalhes da indentificação destas proteínas a partir do programa Mascot (Matrix Science) e da anotação das proteínas encontradas a partir de buscas por BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Os experimentos de *pull-down* com 6HisGlnK foram realizados comparando diferentes quantidades de proteína isca (5, 10, 15 ou 20µg). A Figura 4.7 apresenta os resultados obtidos, não sendo, no entanto, detectadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de proteína isca (Figura 4.7). Paralelamente, realizou-se experimento com 6 réplicas de 15µg de proteína 6HisGlnK, que foram combinadas e aplicadas em gel de SDS-PAGE 17% para posterior tripsinização e análise por LC-MS/MS (Figura 4.7). As identificações significativas e com *score* acima de 40 estão apresentadas na Figura 4.7, junto com as respectivas massas moleculares teóricas.

A purificação da proteína 6HisGlnK apresentava algumas proteínas ribossômicas (ou relacionadas) contaminantes providas de *E. coli*. A sua presença resultou no isolamento de diversas proteínas ribossômicas de *A. amazonense* pelos experimentos de *pull-down*. Essas proteínas estão marcadas em cinza na Figura 4.7. Para a avaliação de quais proteínas pertencem a *E. coli*, todos os espectros de MS/MS

foram analisados tanto para banco de dados de *E. coli* como para o de *A. amazonense* pelo programa Mascot. A Tabela 4.2 traz detalhes das identificações significativas encontradas nos dois bancos de dados. Os dados estão de acordo com a análise visual das bandas presentes antes e após o experimento de *pull-down* (Figura 4.7). Os resultados da anotação destas proteínas através de buscas por similaridade no banco de proteínas não redundantes do NCBI também constam na Tabela 4.2.

4.3 *Pull-down* de GlnB e GlnK uridiladas com extrato proteico de *A. amazonense* referente à condição de privação de nitrogênio fixado.

Em condições de falta de nitrogênio celular, as proteínas PII são prontamente uridiladas pela enzima uridiltransferase/uridilemovera (UTase/Ur). Esta modificação, no entanto, é reversível: perante um aumento na disponibilidade de nitrogênio, são rapidamente deuridiladas por esta mesma enzima. Nestas condições, as proteínas PII dão início à resposta celular de desligamento das vias alternativas de assimilação de nitrogênio, atuando dentro de um contexto celular diferente do que seria o observado em células mantidas em condições de multiplicação ilimitada. Existem mecanismos de atuação de PII específicos para este momento de transição. Por exemplo, em *E. coli* o bloqueio do canal de amônia do transportador AmtB por GlnK ocorre apenas após a mudança de uma fonte pobre para uma fonte rica de nitrogênio, já que GlnK é expressa apenas em condições de falta de nitrogênio, e não é capaz bloquear AmtB na forma uridilada. Para identificar a presença de alvos celulares expressos apenas sob condições de privação de nitrogênio, realizamos um experimento de *pull-down* de GlnB e GlnK uridiladas com extrato de *A. amazonense* submetido a um estresse de 3h sob ausência de nitrogênio.

Experimentos de *pull-down* e de duplo híbrido em levedura já demonstram que alguns dos receptores celulares são capazes de interagir com PII independente do seu estado de uridilação, embora muitas vezes a uridilação seja importante para o efeito que PII causa sobre o receptor (LEIGH & DODSWORTH, 2007). É o caso, por exemplo, do fator transcricional NifA (CHEN *et al.*, 2005; PAWLOWSKI *et al.*, 2003) e da enzima ATase (JAGGI *et al.*, 1997; NINFA & JIANG, 2005). Portanto, nos experimentos de *pull-down* realizados podemos encontrar também alguns dos alvos celulares de PII

uridilada. As Figuras 4.8 e 4.9 apresentam os resultados obtidos para GlnB e GlnK, respectivamente, em experimentos realizados paralelamente.

Nestes mesmos experimentos realizamos um teste preliminar do efeito da adição de ATP e 2-oxoglutarato (2OG) sobre a interação *in vitro* de PII com proteínas do extrato de *A. amazonense*. Utilizamos a concentração de 1mM de ATP, que seria suficiente para ocupar os três sítios de nucleotídeos do trímero de PII, como acontece na faixa fisiológica (JIANG *et al.*, 1998a; FORCHHAMMER, 2007). Foi selecionada para os experimentos a concentração de 50µM de 2OG, que, segundo alguns estudos, seria a concentração ótima para o estímulo da atividade de fosfatase de NtrB por PII de *E. coli in vitro* (que requer a interação PII-NtrB) (JIANG *et al.*, 1998b; JIANG & NINFA, 1999). Essa concentração está abaixo da faixa fisiológica estimada para *E. coli* em condições de suficiência de nitrogênio, que seria de 0,1 a 0,9 mM (SENIOR, 1975; JIANG *et al.*, 1998). Concentrações subfisiológicas (micromolares) de 2OG são suficientes para a ligação de uma molécula ao trímero de PII, enquanto que a ligação da segunda molécula possui uma constante de dissociação de 2mM (JIANG *et al.*, 1998b; JIANG & NINFA, 1999). Já que concentrações micromolares estimulam a interação PII-NtrB e concentrações milimolares inibem (JIANG & NINFA, 1999), acredita-se que PII ligada a uma molécula de 2OG seria a forma mais ativa (LEIGH & DODSWORTH, 2007). Portanto, decidimos trabalhar com esta forma de PII em nossos experimentos.

Como pode ser visto nas Figuras 4.8 e 4.9, a adição de ATP e 2OG não alterou de maneira geral o padrão de bandas proteicas. Algumas diferenças pontuais podem ser vistas: a banda da identificação 5 no *pull-down* N- de GlnB e a banda das identificação 6 a 9 em PD GlnK N- estão ausentes no experimento utilizando ATP e 2OG. Embora os experimentos com e sem ATP/2OG não foram apresentados nas mesmas concentrações, bandas bem mais fracas do que as citadas podem ser visualizadas claramente no teste com ATP e 2OG. Esse experimento servirá como ponto de partida para a elaboração de experimentos mais robustos para a avaliação do efeito dos efetores de PII.

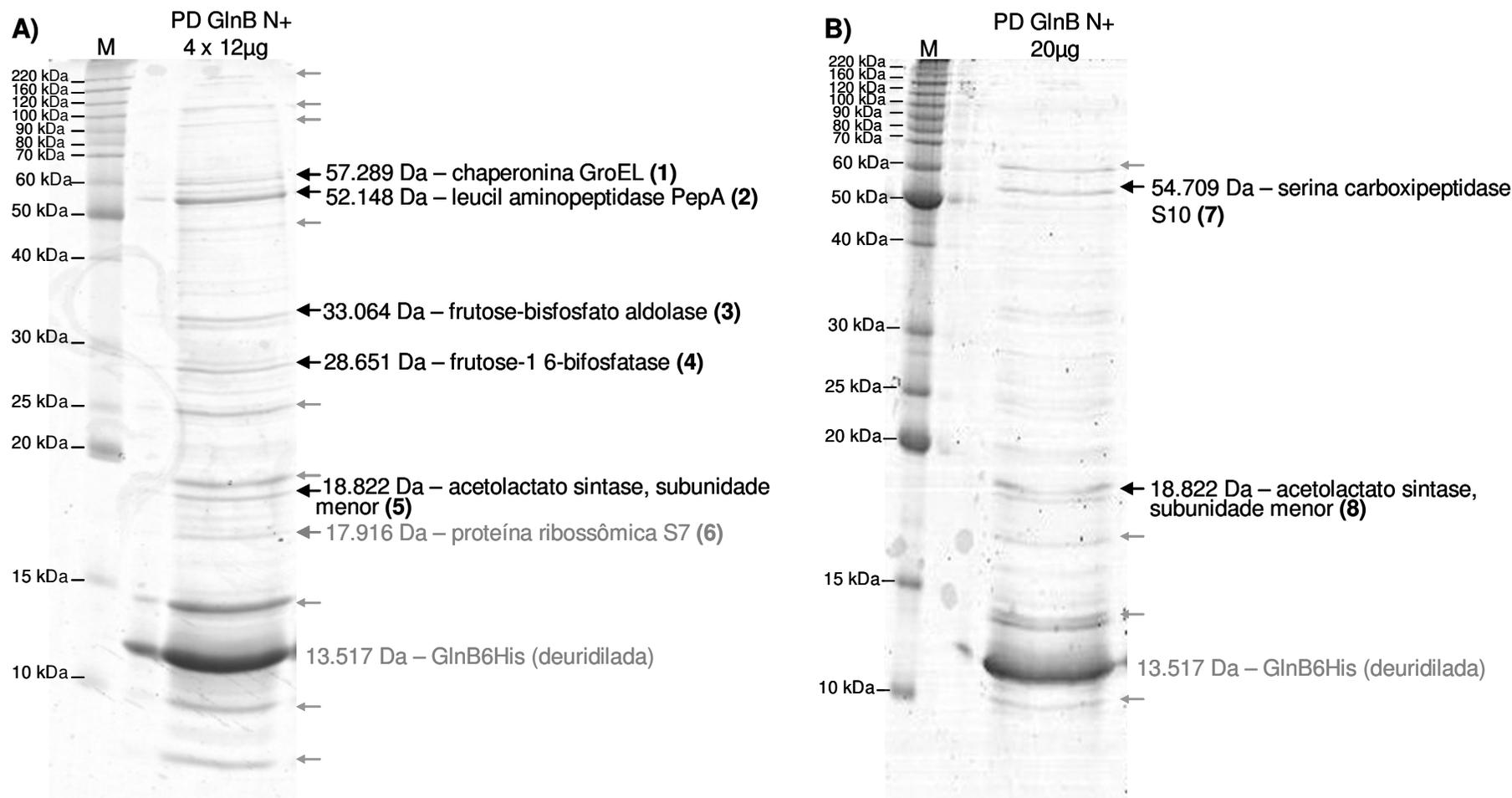


FIGURA 4.6 Pull-down da proteína GlnB deuterilada contra extrato proteico de *A. amazonense* cultivado em condições de abundância de nitrogênio.

A) Gel de SDS-PAGE 17% resultante da combinação de 4 réplicas independentes utilizando 12 µg de proteína GlnB6His purificada. **B)** Gel de SDS-PAGE 17% mostrando experimento independente utilizando 20µg GlnB6His. Setas marcam as bandas recortadas, tripsinizadas e submetidas a LC-MS/MS em um aparelho ESI-QUAD-TOF (Waters). Setas cinzas pequenas denotam proteínas que não puderam ser identificadas no banco de dados parcial de *A. amazonense* ou no banco de dados de *E. coli*, enquanto que setas grandes indicam proteínas identificadas com *scores* de confiança (ver Tabela 4.1). Todas as proteínas identificadas pertencem a *A. amazonense*. Proteínas ribossômicas, falso positivos comuns em experimentos de *pull-down*, foram marcadas em cinza. A massa molecular teórica de cada proteína identificada é apresentada. M: marcador de peso molecular.

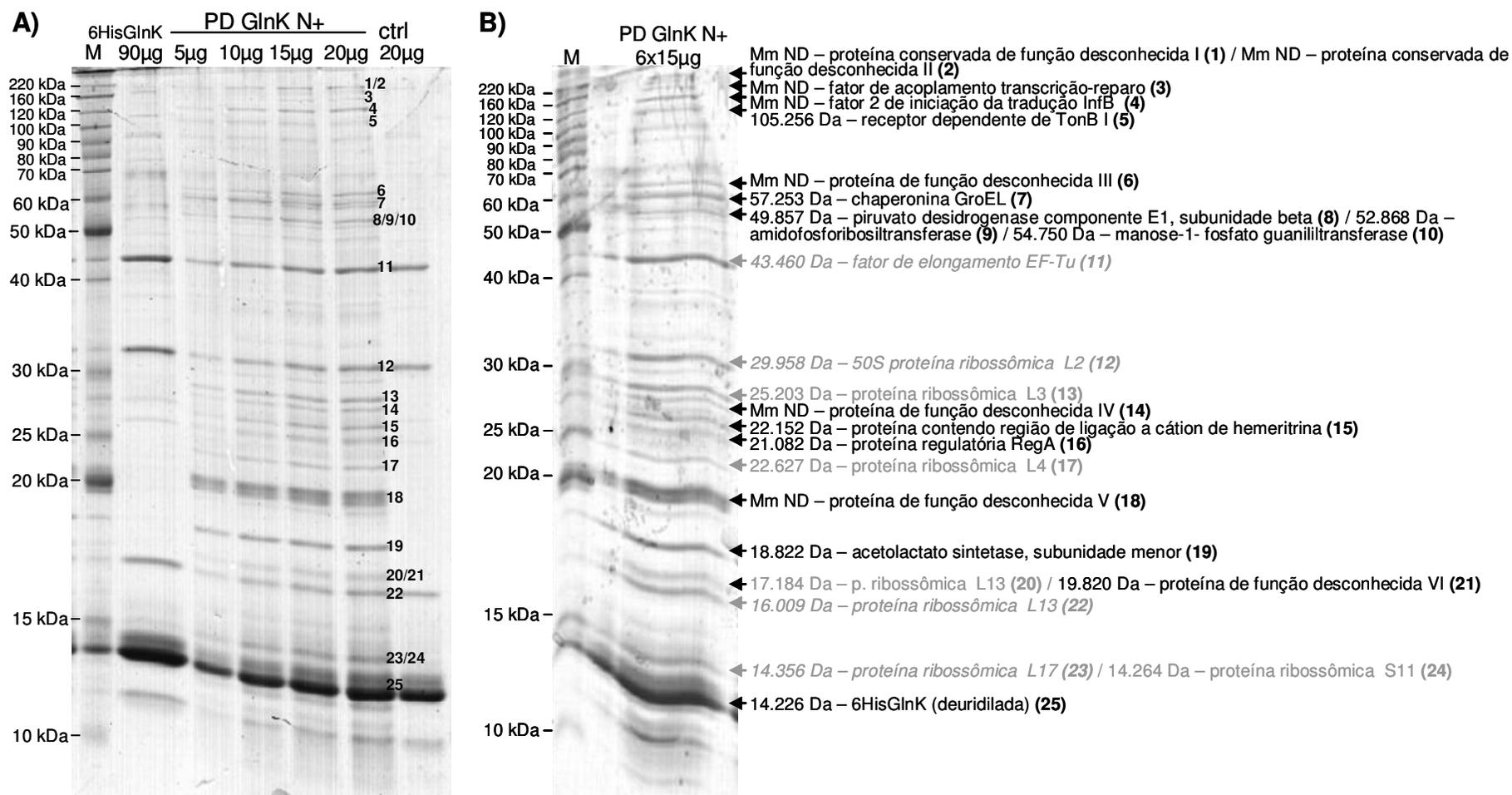


FIGURA 4.7 Pull-down da proteína GlnK deuridilada contra extrato proteico de *A. amazonense* cultivado em condições de abundância de nitrogênio. A) Gel de SDS-PAGE 17% apresentando experimentos de *pull-down* utilizando diferentes quantidades de proteína 6HisGlnK parcialmente purificada. Para a visualização das bandas provindas de contaminação por proteínas de *E. coli*, o equivalente a 90µg de proteína imobilizada nas contas magnéticas foi aplicado no gel. ctrl denota experimento controle de *pull-down* com 20µg de proteína isca, realizado sem extrato proteico de *A. amazonense*. B) Combinação de 6 réplicas utilizando 15µg de proteína isca. Setas denotam proteínas tripsinizadas e submetidas a LC-MS/MS em um aparelho ESI-QUAD-TOF (Waters). Proteínas identificadas com confiança (ver Tabela 4.2) nos bancos de dados de *E. coli* (em itálico e cinza) ou de *A. amazonense* (texto normal) estão listadas, juntamente com suas respectivas massas moleculares teóricas. A cor cinza marca proteínas ribossômicas ou relacionadas. Mm ND: Massa molecular não definida, proteínas apresentando apenas sequências parciais no banco de dados, impossibilitando cálculo de Mm. M: Marcador de peso molecular.

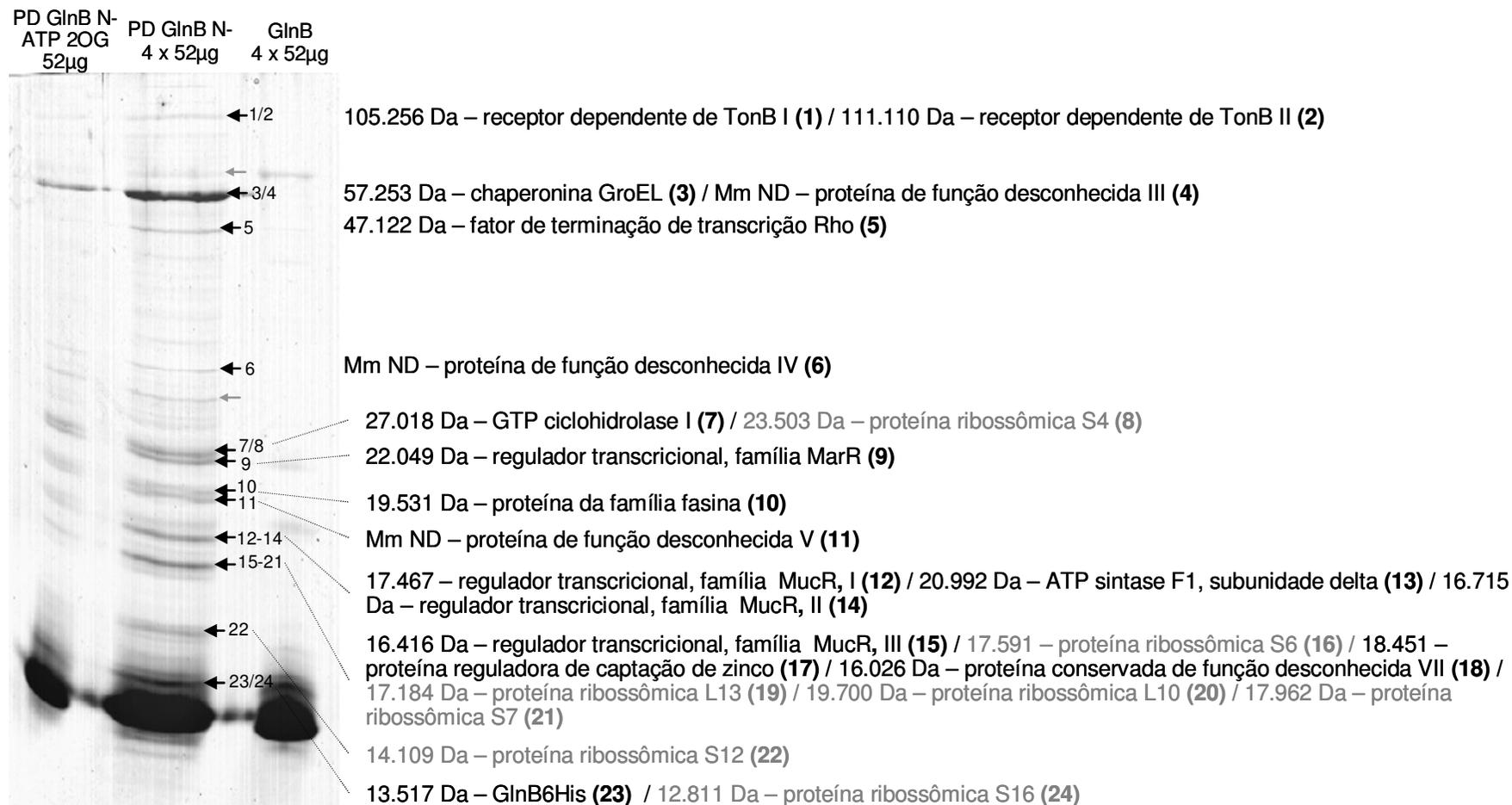


FIGURA 4.8 Pull-down da proteína GlnB deuridilada contra extrato proteico de *A. amazonense* submetido a ausência de nitrogênio fixado. Gel de SDS-PAGE 17% apresentando experimentos de pull-down utilizando aproximadamente 52µg de proteína GlnB6His purificada. Em PD GlnB N- ATP/2OG, foram acrescidos 1mM de ATP e 50 µM de 2OG no extrato proteico e no tampão de lavagem. Em PD GlnB N-, quatro réplicas do experimento sem ATP e 2OG foram combinadas, de forma a garantir a quantidade de proteína necessária para a identificação por LC-MS/MS. Setas denotam bandas cortadas, tripsinizadas e submetidas a LC-MS/MS em um aparelho ESI-QUAD-TOF (Waters). Setas menores correspondem a bandas que não apresentaram resultados significativos, enquanto que setas maiores indicam proteínas identificadas com confiança (ver Tabela 4.3). As proteínas identificadas estão listadas, juntamente com suas respectivas massas moleculares teóricas. Como controle da qualidade da purificação de GlnB6His, quantidade equivalente a apresentada em PD GlnB N- foi aplicada no gel. Mesmo que algumas bandas fracas pudessem ser observadas nesse controle, nenhuma proteína de *E. coli* foi identificada nas amostras. Proteínas ribossômicas de *A. amazonense* foram marcadas de cinza. Mm ND: Massa molecular não definida, proteínas apresentando apenas sequências parciais no banco de dados, impossibilitando cálculo de Mm.



FIGURA 4.9 Pull-down da proteína GlnK deuridilada contra extrato proteico de *A. amazonense* submetido a ausência de nitrogênio fixado. Gel de SDS-PAGE 17% apresentando experimentos de *pull-down* utilizando aproximadamente 44µg de proteína 6HisGlnK parcialmente purificada. Em PD GlnK N-ATP/2OG, foram acrescentados 1mM de ATP e 50 µM de 2OG no extrato proteico e no tampão de lavagem. Em PD GlnK N-, quatro réplicas do experimento sem ATP e 2OG foram combinadas, de forma a garantir a quantidade de proteína necessária para a identificação por LC-MS/MS. Para a visualização das bandas providas de contaminação por proteínas de *E. coli*, quantidade equivalente de 6HisGlnK foi aplicada no gel. Setas denotam bandas recortadas, tripsinizadas e submetidas a LC-MS/MS em um aparelho ESI-QUAD-TOF (Waters). Proteínas identificadas com alta confiança (ver Tabela 4.4) nos bancos de dados de *E. coli* (em itálico e cinza) ou de *A. amazonense* (texto normal) estão listadas, juntamente com suas respectivas massas moleculares teóricas. Proteínas ribossômicas foram marcadas em cinza. Mm ND: Massa molecular não definida, proteínas apresentando apenas sequências parciais no banco de dados, impossibilitando cálculo de Mm.

TABELA 4.1 Proteínas identificadas por *pull-down* utilizando a proteína GlnB deuridilada e extrato proteico de *A. amazonense* cultivado em condições de abundância de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.

ID ^a	MASCOT			BLAST ^d		
	Score ^b	Cobertura	N.º Peptídeos identificados ^c	Score (bits)/ Valor E	Identidade/ Similaridade	Resultado de maior pontuação Ref. NCBI / Definição
1	176	17%	7	911 / 0.0	86% / 93%	YP_002298788.1 chaperonin GroL, putative [Rhodospirillum centenum SW]
2	479	24%	9	708 / 0.0	70% / 83%	YP_002297782.1 leucyl aminopeptidase PepA, putative [Rhodospirillum centenum SW]
3	412	22%	5	508 / 4e-142	78% / 88%	YP_002298031.1 fructose-bisphosphate aldolase [Rhodospirillum centenum SW]
4	261	15%	3	358 / 4e-97	66% / 78%	YP_420649.1 fructose-1 6-bisphosphatase [Magnetospirillum magneticum AMB-1]
5	174	23%	4	273 / 5e-72	83% / 91%	YP_002298181.1 acetolactate synthase, small subunit [Rhodospirillum centenum SW]
6	87	16%	2	292 / 7e-78	88% / 94%	YP_002296951.1 ribosomal protein S7 [Rhodospirillum centenum SW]
7	56	6%	2	566 / 2e-159	56% / 70%	YP_002027832.1 peptidase S10 serine carboxypeptidase [Stenotrophomonas maltophilia R551-3]
8	46	23%	3	273 / 5e-72	83% / 91%	YP_002298181.1 acetolactate synthase, small subunit [Rhodospirillum centenum SW]

^a Identificação conforme numeração da Figura 6.

^b Soma dos *scores* de íons únicos, onde o *score* probabilístico de um íon é dado por $-10 \times \log(P)$, onde P é a probabilidade do resultado ser um evento aleatório.

^c Número de peptídeos únicos identificados

^d BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) proteína/proteína utilizando o banco de dados não redundante do NCBI, com parâmetros de busca padrão.

TABELA 4.2 Proteínas identificadas por *pull-down* utilizando a proteína GlnK deuridilada e extrato proteico de *A. amazonense* cultivado em condições de abundância de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.

ID ^a	MASCOT			BLAST ^g		
	Score ^b	Cobertura	N.º Peptídeos identificados ^c	Score (bits)/ Valor E	Identidade/ Similaridade	Resultado de maior pontuação (Ref. NCBI / Definição)
1	77 ^{d,f}	8% ^f	4 ^f	354 / 1e-95	44% / 60%	YP_002299823.1 hypothetical protein RC1_3662 [Rhodospirillum centenum SW]
2	47 ^{d,f}	13% ^f	3 ^f	333 / 1e-89	55% / 70%	YP_002299823.1 hypothetical protein RC1_3662 [Rhodospirillum centenum SW]
3	48 ^{d,f}	3% ^f	3 ^f	1560 / 0.0	79% / 87%	YP_002297483.1 transcription-repair coupling factor [Rhodospirillum centenum SW]
4	229 ^{d,f}	27% ^f	12 ^f	995 / 0.0	85% / 91%	YP_002299092.1 translation initiation factor 2 InfB [Rhodospirillum centenum SW]
5	71 ^d	7%	5	1008 / 0.0	53% / 69%	YP_002299878.1 TonB-dependent receptor, putative [Rhodospirillum centenum SW]
6	91 ^{d,f}	12% ^f	1 ^f	34.3 / 4.7	27% / 50%	ZP_04027122.1 short-chain dehydrogenase of unknown substrate specificity [Tsukamurella paurometabola DSM 20162]
7	226 ^d	29%	12	911 / 0.0	86% / 93%	YP_002298788.1 chaperonin GroL, putative [Rhodospirillum centenum SW]
8	145 ^d	20%	7	711 / 0.0	75% / 84%	ZP_02187226.1 Pyruvate dehydrogenase E1 component, beta subunit [alpha proteobacterium BAL199]
9	94 ^d	9%	4	791 / 0.0	82% / 88%	YP_002297801.1 amidophosphoribosyltransferase [Rhodospirillum centenum SW]
10	89 ^d	9%	4	585 / 4e-165	64% / 78%	YP_002296434.1 mannose-1-phosphate guanylyltransferase [Rhodospirillum centenum SW]
11	646 ^e	49%	14	676 / 0.0	100% / 100%	NP_312930.1 elongation factor Tu [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]
12	185 ^e	25%	6	524 / 3e-147	100% / 100%	NP_289878.1 50S ribosomal protein L2 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]
13	79 ^d	39%	9	401 / 3e-110	81% / 90%	YP_002296955.1 ribosomal protein L3 [Rhodospirillum centenum SW]
14	192 ^{d,f}	44% ^f	5 ^f	42.7 / 0.011	36% / 53%	ZP_03585219.1 ProQ activator of osmoprotectant transporter ProP [Burkholderia multivorans CGD1]
15	47 ^d	32%	7	298 / 1e-79	84% / 93%	YP_001683049.1 hemerythrin HHE cation binding region protein [Caulobacter sp. K31]

16	88 ^d	29%	5	286 / 5e-76	90% / 97%	YP_002298736.1 photosynthetic apparatus regulatory protein RegA [Rhodospirillum centenum SW]
17	126 ^d	49%	10	353 / 6e-96	84% / 88%	YP_002296956.1 ribosomal protein L4 [Rhodospirillum centenum SW]
18	125 ^{d,f}	5% ^f	2 ^f	134 / 3e-29	51% / 64%	YP_001857267.1 SH3 type 3 domain-containing protein [Burkholderia phymatum STM815]
19	591 ^d	58%	12	273 / 5e-72	83% / 91%	YP_002298181.1 acetolactate synthase, small subunit [Rhodospirillum centenum SW]
20	68 ^d	8%	1	276 / 4e-73	87% / 92%	YP_002297532.1 ribosomal protein L13 [Rhodospirillum centenum SW]
21	49 ^d	15%	3	37.7 / 0.52	27% / 47%	NP_602244.1 short chain dehydrogenase [Corynebacterium glutamicum ATCC13032]
22	314 ^e	59%	7	291 / 2e-77	100% / 100%	ZP_04536504.1 50S ribosomal subunit protein L13 [Escherichia sp. 3_2_53FAA]
23	140 ^e	14%	3	249 / 6e-65	100% / 100%	NP_289855.1 50S ribosomal protein L17 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]
24	128 ^d	46%	5	250 / 3e-65	93% / 98%	YP_002296978.1 ribosomal protein S11 [Rhodospirillum centenum SW]
25	813 ^d	61%	7	164 / 2e-39	74% / 85%	CAA63238.1 PII-like protein Pz [Azospirillum brasilense]

^a Identificação conforme numeração da Figura 7.

^b Soma dos *scores* de íons únicos, onde o *score* probabilístico de um íon é dado por $-10 \times \log(P)$, onde P é a probabilidade do resultado ser um evento aleatório.

^c Número de peptídeos únicos identificados.

^d *Score* referente ao banco de dados de *A. amazonense*.

^e *Score* referente ao banco de dados de *E. coli* (dados em cinza)

^f Dados referentes a sequências parciais no banco de dados (em itálico).

^g BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) proteína/proteína utilizando o banco de dados não redundante do NCBI, com parâmetros de busca padrão.

TABELA 4.3 Proteínas identificadas por *pull-down* utilizando a proteína GlnB deuridilada e extrato proteico de *A. amazonense* submetido a condições de falta de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.

ID ^a	MASCOT			BLAST ^e		
	Score ^b	Cobertura	N.º Peptídeos identificados ^c	Score (bits)/ Valor E	Identidade/ Similaridade	Resultado de maior pontuação (Ref. NCBI / Definição)
1	135	17%	12	935 / 0.0	52% / 68%	YP_002299878.1 TonB-dependent receptor, putative [Rhodospirillum centenum SW]
2	56	8%	6	419 / 7e-115	34% / 50%	YP_002296656.1 TonB-dependent receptor, putative [Rhodospirillum centenum SW]
3	334	25%	9	783 / 0.0	86% / 93%	YP_002298788.1 chaperonin GroL, putative [Rhodospirillum centenum SW]
4	160 ^d	65% ^d	7 ^d	34.3 / 4.7	27% / 50%	ZP_04027122.1 short-chain dehydrogenase of unknown substrate specificity [Tsukamurella paurometabola DSM 20162]
5	367	45%	19	772 / 0.0	93% / 97%	YP_002298978.1 Transcription termination factor Rho [Rhodospirillum centenum SW]
6	160 ^d	68% ^d	7 ^d	42.7 / 0.011	36% / 53%	ZP_03585219.1 ProQ activator of osmoprotectant transporter ProP [Burkholderia multivorans CGD1]
7	280	51%	13	365 / 2e-99	86% / 91%	YP_002298573.1 GTP cyclohydrolase I [Rhodospirillum centenum SW]
8	129	37%	10	360 / 5e-98	84% / 93%	YP_002297217.1 ribosomal protein S4 [Rhodospirillum centenum SW]
9	164	64%	8	224 / 3e-57	64% / 73%	YP_002297009.1 Transcriptional regulator, MarR family protein [Rhodospirillum centenum SW]
10	55	20%	4	163 / 9e-39	56% / 80%	YP_002297904.1 phasin family protein [Rhodospirillum centenum SW]
11	59 ^d	6% ^d	4 ^d	148 / 1e-33	49% / 63%	YP_676491.1 SH3, type 3 [Mesorhizobium sp. BNC1]
12	259	68%	9	164 / 2e-39	58% / 70%	ZP_06122288.1 transcriptional regulator, MucR family [Caulobacter segnis ATCC 21756]
13	55	6%	1	223 / 6e-57	76% / 90%	YP_002298444.1 ATP synthase F1, delta subunit [Rhodospirillum centenum SW]
14	46	25%	3	181 / 2e-44	64% / 82%	YP_002298801.1 transcriptional regulatory protein MucR [Rhodospirillum centenum SW]
15	425	38%	5	230 / 4e-59	76% / 84%	YP_002297561.1 transcriptional regulatory protein MucR [Rhodospirillum centenum SW]

16	76	30%	3	184 / 3e-45	82% / 92%	YP_002297789.1 ribosomal protein S6 [Rhodospirillum centenum SW]
17	<i>73^d</i>	<i>7%^d</i>	<i>2^d</i>	214 / 6e-54	73% / 84%	YP_002296839.1 zinc uptake regulation protein [Rhodospirillum centenum SW]
18	67	17%	2	138 / 2e-31	85% / 90%	YP_002298822.1 hypothetical protein RC1_2635 [Rhodospirillum centenum SW]
19	56	8%	1	275 / 8e-73	87% / 92%	YP_002297532.1 ribosomal protein L13 [Rhodospirillum centenum SW]
20	47	5%	1	229 / 1e-58	76% / 86%	YP_002296943.1 ribosomal protein L10 [Rhodospirillum centenum SW]
21	46	7%	1	245 / 9e-64	88% / 94%	YP_002296951.1 ribosomal protein S7 [Rhodospirillum centenum SW]
22	55	26%	5	231 / 2e-59	92% / 94%	YP_002296950.1 ribosomal protein S12 [Rhodospirillum centenum SW]
23	332	68%	10	214 / 2e-54	96% / 98%	YP_002297478.1 nitrogen regulatory protein P-II [Rhodospirillum centenum SW]
24	40	8%	1	157 / 4e-37	73% / 90%	YP_002298407.1 ribosomal protein S16 [Rhodospirillum centenum SW]

^a Identificação conforme numeração da Figura 8.

^b Soma dos *scores* de íons únicos, onde o *score* probabilístico de um íon é dado por $-10 \times \log(P)$, onde P é a probabilidade do resultado ser um evento aleatório.

^c Número de peptídeos únicos identificados.

^d Dados referentes a sequências parciais no banco de dados (em itálico).

^e BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) proteína/proteína utilizando o banco de dados não redundante do NCBI, com parâmetros de busca padrão.

TABELA 4.4 Proteínas identificadas por *pull-down* utilizando a proteína GlnK deuridilada e extrato proteico de *A. amazonense* submetido a condições de falta de nitrogênio. Identificação e anotação pelos programas MASCOT e BLAST.

ID ^a	MASCOT			BLASTp ^g		
	Score ^b	Cobertura	N.º Peptídeos identificados ^c	Score (bits)/ Valor E	Identidade/ Similaridade	Resultado de maior pontuação (Ref. NCBI / Definição)
1	117 ^{d,f}	45% ^f	5 ^f	34.3 / 4.7	27% / 50%	ZP_04027122.1 short-chain dehydrogenase of unknown substrate specificity [Tsukamurella paurometabola DSM 20162]
2	341 ^d	51%	22	772 / 0.0	93% / 97%	YP_002298978.1 transcription termination factor Rho [Rhodospirillum centenum SW]
3	40 ^d	9%	3	696 / 0.0	75% / 85%	CAM75494.1 Dihydropyridyl dehydrogenase (E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases complexes) [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]
4	982 ^e	58%	18	676 / 0.0	100% / 100%	NP_312930.1 elongation factor Tu [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]
5	49 ^d	4%	1	357 / 1e-96	55% / 65%	YP_841196.1 siderophore biosynthesis related protein/ acetyltransferase or N-acetylase of ribosomal proteins (CO [Ralstonia eutropha H16])
6	226 ^{d,f}	41% ^f	8 ^f	218 / 2e-55	77% / 88%	YP_002296936.1 RNA methyltransferase, TrmH family, group 3 [Rhodospirillum centenum SW]
7	12 ^d	15%	6	513 / 1e-143	85% / 91%	YP_002296381.1 pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit [Rhodospirillum centenum SW]
8	78 ^d	12%	3	577 / 8e-163	86% / 91%	YP_002298027.1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I [Rhodospirillum centenum SW]
9	67 ^e	4%	2	739 / 0.0	100% / 100%	NP_415449.1 outer membrane porin 1a (Ia;b;F) [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]
10	260 ^e	40%	9	524 / 3e-147	100% / 100%	NP_289878.1 50S ribosomal protein L2 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]
11	157 ^{d,f}	44% ^f	5 ^f	42.7 / 0.011	36% / 53%	ZP_03585219.1 ProQ activator of osmoprotectant transporter ProP [Burkholderia multivorans CGD1]
12	68 ^d	25%	6	367 / 5e-100	81% / 89%	YP_002298018.1 hypothetical protein RC1_1808 [Rhodospirillum centenum SW]
13	154 ^d	40%	10	363 / 1e-98	81% / 90%	YP_002296955.1 ribosomal protein L3 [Rhodospirillum centenum SW]
14	74 ^d	8%	1	164 / 3e-39	74% / 85%	CAA63238.1 PII-like protein Pz [Azospirillum brasilense]

15	94 ^d	34%	8	375 / 2e-102	90% / 93%	YP_002296961.1 ribosomal protein S3 [Rhodospirillum centenum SW]
16	100 ^d	45%	9	365 / 2e-99	86% / 91%	YP_002298573.1 GTP cyclohydrolase I [Rhodospirillum centenum SW]
17	93 ^d	21%	3	256 / 9e-67	91% / 95%	YP_002296972.1 ribosomal protein S5 [Rhodospirillum centenum SW]
18	76 ^d	8%	2	209 / 2e-52	53% / 66%	YP_984249.1 TetR family transcriptional regulator [Polaromonas naphthalenivorans CJ2]
19	49 ^d	31%	6	360 / 5e-98	84% / 93%	YP_002297217.1 ribosomal protein S4 [Rhodospirillum centenum SW]
20	166 ^d	63%	10	224 / 3e-57	64% / 73%	YP_002297009.1 transcriptional regulator, MarR family protein [Rhodospirillum centenum SW]
21	135 ^d	44%	9	342 / 2e-92	84% / 88%	YP_002296956.1 ribosomal protein L4 [Rhodospirillum centenum SW]
22	119 ^d	25%	4	256 / 9e-67	91% / 95%	YP_002296972.1 ribosomal protein S5 [Rhodospirillum centenum SW]
23	71 ^d	6%	1	164 / 9e-39	50% / 59%	YP_368270.1 hypothetical protein Bcep18194_A4029 [Burkholderia sp. 383]
24	46 ^d	12%	2	137 / 8e-31	47% / 62%	YP_001262222.1 XRE family transcriptional regulator [Sphingomonas wittichii RW1]
25	44 ^d	41%	8	257 / 4e-67	72% / 91%	YP_002296970.1 ribosomal protein L6 [Rhodospirillum centenum SW]
26	405 ^d	61%	7	164 / 2e-39	58% / 70%	ZP_06122288.1 transcriptional regulator, MucR family [Caulobacter segnis ATCC 21756]
27	88 ^d	38%	5	181 / 2e-44	64% / 82%	YP_002298801.1 transcriptional regulatory protein MucR [Rhodospirillum centenum SW]
28	212 ^d	50%	5	230 / 4e-59	76% / 84%	YP_002297561.1 transcriptional regulatory protein MucR [Rhodospirillum centenum SW]
29	50 ^d	11%	2	138 / 2e-31	85% / 90%	YP_002298822.1 hypothetical protein RC1_2635 [Rhodospirillum centenum SW]
30	122 ^d	30%	5	245 / 9e-64	88% / 94%	YP_002296951.1 ribosomal protein S7 [Rhodospirillum centenum SW]
31	56 ^d	30%	3	167 / 3e-40	65% / 80%	YP_002298801.1 transcriptional regulatory protein MucR [Rhodospirillum centenum SW]
32	170 ^e	31%	5	291 / 2e-77	100% / 100%	ZP_04536504.1 50S ribosomal subunit protein L13 [Escherichia sp. 3_2_53FAA]

33	189 ^d	48%	4	164 / 3e-39	74% / 85%	CAA63238.1 PIL-like protein Pz [Azospirillum brasilense]
34	148 ^d	42%	6	250 / 3e-65	93% / 98%	YP_002296978.1 ribosomal protein S11 [Rhodospirillum centenum SW]
35	81 ^d	16%	1	113 / 7e-24	70% / 83%	YP_002298801.1 transcriptional regulatory protein MucR [Rhodospirillum centenum SW]
36	41 ^d	19%	3	231 / 2e-59	92% / 94%	YP_002296950.1 ribosomal protein S12 [Rhodospirillum centenum SW]

^a Identificação conforme numeração da Figura 9.

^b *Score* probabilístico, $-10 \times \log(P)$, onde P é a probabilidade do resultado ser um evento aleatório.

^c Número de peptídeos únicos identificados.

^d *Score* referente ao banco de dados de *A. amazonense*.

^e *Score* referente ao banco de dados de *E. coli*. (dados em cinza).

^f Dados referentes a sequências parciais no banco de dados (em itálico).

^g BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) proteína/proteína utilizando o banco de dados não redundante do NCBI, com parâmetros de busca padrão.

5. DISCUSSÃO

5.1 Proteínas de interação de GlnB e GlnK de *A. amazonense*

A caracterização das associações moleculares de uma proteína tem se tornado um elemento crítico para a análise da sua função biológica, juntamente com os estudos de expressão e localização subcelular. O estudo de interações proteína-proteína por espectrometria de massas tem tomado uma posição de importância crescente entre as estratégias pós-genômicas para a elucidação dos papéis biológicos das proteínas. Uma variedade de métodos baseados em espectrometria de massas permite a caracterização de complexos proteicos celulares sob condições próximas ao fisiológico, permitindo subsequentemente a designação de proteínas individuais a máquinas moleculares, vias metabólicas ou redes de sinalização específicas (KOCHER & SUPERTI-FURGA, 2007).

Existem duas abordagens fundamentais distintas para a proteômica. O conceito original de proteômica – proteômica baseada em expressão – está tradicionalmente ligado à eletroforese bidimensional, e pode ser definido como a tentativa de catalogar a expressão de todas as proteínas presentes em células, tecidos ou organismos, ou a análise diferencial de sistemas biológicos reagindo a determinado estímulo (GORG *et al.*, 2004). A outra abordagem – proteômica funcional – é fundamentalmente e estrategicamente diferente. A maioria das funções celulares é desempenhada por complexos proteicos, que atuam como máquinas moleculares. O termo “proteômica funcional” deriva da hipótese de que a associação de proteínas sugere o seu envolvimento em uma função biológica comum (MONTI *et al.*, 2007).

Existem diferentes tecnologias para a proteômica funcional, baseadas em (1) experimentos de purificação de complexos por afinidade e determinação das proteínas associadas (2) testes par a par de interação através de automação bioquímica ou tecnologia de *chip* (3) testes baseados em leitura genética, como por exemplo as técnicas de duplo híbrido e *phage-display* e (4) predições computacionais, muitas vezes baseadas em estruturas tridimensionais e domínios de ligação conhecidos (KOCHER & SUPERTI-FURGA, 2007).

As abordagens bioquímicas para o mapeamento de interações proteína-proteína podem ser classificadas em dois grupos: métodos de isolamento de complexos celulares

endógenos e métodos *in vitro* utilizando proteínas recombinantes. O isolamento de complexos endógenos pode ser feito através de métodos baseados em anticorpos, como imunoprecipitação, e métodos baseados em purificação bioquímica ou por cromatografia de afinidade (MONTI *et al.*, 2009). O método *in vitro* é mais simples, e utiliza proteínas recombinantes imobilizadas (proteínas “isca”) para capturar as proteínas de interação através da sua exposição ao extrato proteico relevante. Após várias lavagens brandas, as proteínas que permanecerem ligadas são eluídas e identificadas por espectrometria de massas. Essa técnica é comumente denominada *pull-down*.

Neste trabalho foi selecionada a abordagem *in vitro*, utilizando proteínas recombinantes. Um dos motivos para tal é a indisponibilidade das ferramentas necessárias para o isolamento de complexos endógenos, não existindo no momento anticorpos comerciais para proteínas PII. Além disso, até o momento não foram relatados estudos na literatura que dispusessem de anticorpos específicos para cada um dos parálogos de PII (GlnB ou GlnK), dada a sua semelhança. A abordagem de introdução de uma *tag* de afinidade (como uma cauda de histidinas) à proteína endógena e posterior isolamento dos complexos formados *in vivo* por cromatografia de afinidade já foi empregada com sucesso para estudos de interação par a par de proteínas PII de *Azospirillum brasilense* (HUERGO *et al.*, 2006b). Embora nosso grupo de pesquisa venha investindo esforços para criar as ferramentas moleculares para o estudo de *A. amazonense*, ainda não dispomos de um sistema de transformação eficiente e de vetores de clonagem e expressão conhecidamente estáveis em *A. amazonense*. O método *in vitro*, utilizando proteínas recombinantes, tem como vantagem, além da maior facilidade técnica em expressar e purificar as proteínas de interesse em *E. coli*, a possibilidade de investigar o efeito de diferentes concentrações dos efetores ATP e 2OG sobre as interações observadas. Além disso, uma metodologia de *pull-down* muito semelhante à que nós empregamos foi utilizada no estudo que identificou a N-acetil glutamato cinase como o alvo da proteína PII plastidial de *Arabidopsis thaliana* (CHEN *et al.*, 2006). A metodologia *in vitro* também foi utilizada para a caracterização do efeito de ATP, ADP e 2OG nas interações GlnZ-DraG e GlnB-DraT de *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2009).

Uma vez que a espectrometria de massas é uma técnica de identificação bastante sensível, um efeito indesejado é o fato de proteínas contaminantes como queratinas e proteínas celulares altamente abundantes, de difícil remoção, também serem

identificadas em experimentos de purificação. No caso de experimentos investigando interações par a par específicas, ou de experimentos de baixa escala, esses contaminantes não impõe problemas substanciais para a validação dos achados, e podem ser removidos do conjunto de dados tomando como base os conhecimentos biológicos e o conjunto experimental utilizado (KOCHER & SUPERTI-FURGA, 2007). Idealmente, possíveis interações devem ser validadas tanto por métodos *in vivo* como *in vitro*. Proteínas de interação putativas podem ser avaliadas ainda por vários outros métodos ortogonais, como estudos de co-localização e estudos de ganho ou perda de função (KOCHER & SUPERTI-FURGA, 2007).

O trabalho aqui apresentado teve como objetivo realizar um mapeamento geral de quais processos regulatórios as proteína PII de *A. amazonense* podem fazer parte. Em nossos experimentos de *pull-down*, utilizamos condições de estringência relativamente baixas, de forma a garantir o isolamento de interações mais fracas ou transientes, tendo em vista o nosso propósito de investigar a existência de novos alvos celulares destas proteínas.

Realizamos quatro experimentos de *pull-down*, isolando as proteínas de interação de cada um dos parálogos de PII – GlnB ou GlnK – presentes em extratos referentes as duas principais condições celulares fisiológicas relevantes para a sua atuação: falta e abundância de nitrogênio fixado. Nesses experimentos, foram isoladas e identificadas ao todo 55 proteínas de *A. amazonense*. Destas, 20 foram identificadas em mais de um experimento. No entanto, do total de 55 proteínas, 13 correspondem a proteínas ribossômicas que possivelmente foram isoladas devido a sua alta abundância celular (7 delas sendo identificadas em mais de um experimento). Portanto, podemos dizer que identificamos 42 potenciais alvos celulares de PII, 13 deles sendo recorrentes em mais de um experimento. É importante ressaltar que não identificamos todas as proteínas isoladas, como pode ser observado nas Figuras 4.6 a 4.9, especialmente no experimento de *pull-down* de GlnB com extrato referente a suficiência de nitrogênio (Figura 4.6), embora a grande maioria das proteínas observadas em SDS-PAGE tenha sido identificada nos outros 3 experimentos.

A Tabela 5.1 lista as 20 proteínas de *A. amazonense* que foram encontradas em mais de um experimento, indicando em quais destes cada uma pôde ser identificada. É esperado que GlnB e GlnK interajam com as mesmas proteínas, dada a sua alta semelhança estrutural. Isso se reflete na sobreposição de funções desses dois tipos de PII, evidenciada pela observação de efeitos parciais quando um dos dois genes

parálogos é mutado. No entanto, a preservação evolutiva dos dois tipos de PII entre as Proteobactérias tem sido atribuída a especificidades diferentes de GlnB e GlnK para determinadas funções, o que resulta das suas afinidades diferentes para cada alvo celular (LEIGH & DODSWORTH, 2007). Das 20 proteínas identificadas na Tabela 5.1, 17 (13 não ribossômicas) foram identificadas tanto em experimentos utilizando GlnB e GlnK. As 3 proteínas da Tabela 5.1 que não se repetiram para as duas proteínas isca correspondem a proteínas ribossômicas presentes apenas em experimentos com GlnK, o que provavelmente é decorrente da presença de proteínas ribossômicas de *E. coli* que não foram totalmente removidas durante a purificação desta, e que poderiam estar ligando às proteínas ribossômicas de *A. amazonense*.

TABELA 5.1 Proteínas identificadas em mais de um experimento de *pull-down*.

Proteína	Identificação (ID) ^a			
	Extrato proteico N+		Extrato proteico N-	
	GlnB	GlnK	GlnB	GlnK
regulador transcricional, família MucR, I			12	26
regulador transcricional, família MucR, II			14	27
regulador transcricional, família MucR, III			15	28
regulador transcricional, família MarR			9	20
acetolactato sintase, subunidade menor	5, 8	19		
GTP cyclohidrolase I			7	16
receptor dependente de TonB I		5	1	
chaperonina GroEL	1	7	3	
fator de terminação da transcrição Rho			5	2
proteína de função desconhecida III		6	4	1
proteína de função desconhecida IV		14	6	11
proteína de função desconhecida V		18	11	
proteína conservada de função desconhecida VII			18	29
proteína ribossômica S12			22	36
proteína ribossômica S7	6		21	30
proteína ribossômica L3		13		13
proteína ribossômica L4		17		21
proteína ribossômica S11		24		34
proteína ribossômica S4			8	19
proteína ribossômica L13		20	19	

^aCampos em branco indicam que a proteína não foi identificada no experimento de *pull-down* correspondente – proteína isca GlnB ou GlnK com extratos referentes a condição de abundância de nitrogênio (N+) ou privação (N-). Quando a proteína estava presente, o campo encontra-se preenchido com o número de identificação da proteína (ID) conforme as Figuras 4.6 a 4.9 e as Tabelas 4.1 a 4.4.

Não podemos esperar que as mesmas proteínas de interação sejam identificadas nos experimentos utilizando extratos referentes a condições diferentes de disponibilidade de nitrogênio. Isso por que os alvos celulares de PII provavelmente são relacionados à resposta à disponibilidade de nitrogênio, e possivelmente sofrem regulação transcricional de acordo com essa.

Analisando os alvos celulares conhecidos de PII de *E. coli* – AmtB, ATase, NtrB – notamos que apenas a ATase é constitutiva (VAN HEESWIJK *et al.*, 1993), enquanto que AmtB e NtrB tem sua expressão aumentada pelo fator transcricional NtrC sob condições de falta de nitrogênio (ZIMMER *et al.*, 2000). Tanto a forma uridilada quanto a deuridilada de PII interagem com a ATase (JAGGI *et al.*, 1997), enquanto que apenas a forma deuridilada interage com AmtB (JAVELLE & MERRICK, 2005) e com NtrB (JIANG & NINFA, 2009a). Assim, caso empregássemos as condições experimentais testadas no presente estudo de *A. amazonense* em *E. coli*, teoricamente encontraríamos esses três alvos nos experimentos referentes a ambas as condições de disponibilidade de nitrogênio. É difícil prever, no entanto, se experimentalmente os níveis basais de expressão de AmtB e NtrB nos extratos de abundância de nitrogênio seriam suficientes para o seu isolamento pela técnica de *pull-down*. Além disso, uma vez que AmtB é uma proteína transmembrana, muito provavelmente não seria isolada por *pull-down*, uma vez que nesta técnica é utilizada somente a fração celular solúvel.

De fato, não encontramos nenhum dos alvos celulares conhecidos de PII de outras bactérias nos experimentos com *A. amazonense*. Em *A. brasilense*, nem GlnB nem GlnZ parecem ser essenciais à modificação pós-traducional da glutamina sintetase (DE ZAMAROCZY M., 1998), sugerindo que talvez a interação PII-ATase não ocorra em *Azospirillum*. Em *A. brasilense*, está descrito ainda a interação de PII com as enzimas reguladoras da atividade do complexo enzimático nitrogenase DraT e DraG e com o fator transcricional NifA, que regula a transcrição de genes *nif* (*nitrogen fixation*). No entanto, não foram encontrados homólogos de *draTG* em *A. amazonense* (FU *et al.*, 1989). Dada a conservação da sequência primária dos componentes GlnB e NifA entre *A. amazonense* e *A. brasilense*, poder-se-ia esperar que a interação GlnB-NifA também estivesse presente em *A. amazonense*. No entanto, é importante ressaltar que todos os estudos relatando a interação GlnB-NifA em diferentes bactérias, como *A. brasilense*, *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*, utilizaram a metodologia de duplo-híbrido em levedura (CHEN *et al.*, 2005; PAWLOWSKI *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2006). Embora a expressão de *nifA* tenha sido detectada em todas as condições de

crescimento de *A. brasilense*, a presença de oxigênio e amônia reduz os níveis de expressão para 30% da expressão sob condições de fixação de nitrogênio (baixas tensões de O₂ e ausência de amônia) (LIANG *et al.*, 1991). Embora o padrão de expressão de *nifA* em *A. amazonense* não tenha sido investigado até o momento, a presença de oxigênio em nossos cultivos de *A. amazonense* poderia estar influenciando a expressão desse gene. Assim, outras metodologias devem ser empregadas para a investigação do envolvimento de PII na regulação de NifA em *A. amazonense*. O mesmo deve ser feito para investigar o seu envolvimento com o sistema de dois componentes NtrB/NtrC.

Os alvos celulares de PII já caracterizados em diferentes espécies bacterianas são comumente classificados em três tipos: transportadores, enzimas e fatores transcricionais. Entre as proteínas de *A. amazonense* isoladas em nossos experimentos de *pull-down*, foram encontradas diversas enzimas e fatores transcricionais. No entanto, a grande maioria das enzimas encontradas são enzimas de funções metabólicas, e não regulatórias, como NtrB. Além disso, foram identificadas outras proteínas de funções diversas, assim como proteínas de função desconhecida. Dois transportadores transmembrana dependentes de TonB foram encontrados, o que não era esperado, uma vez que proteínas insolúveis são removidas dos extratos proteicos usados na técnica de *pull-down*. Dividimos os resultados encontrados em 7 grupos de acordo com a sua função celular.

5.1.1 Fatores transcricionais

Foram identificados 10 fatores transcricionais em nossos experimentos, 5 do tipo MucR e os demais pertencentes às famílias MarR, XRE, TetR, RegA e Fur. Para facilitar a distinção entre os 5 fatores transcricionais do tipo MucR, estes foram numerados em algarismos romanos nas Figuras 4.8 e 4.9.

Todos os fatores transcricionais da família MucR foram isolados de extratos de *A. amazonense* submetido a falta de nitrogênio fixado. Três destes (MucR I, II e III) foram isolados tanto em experimentos utilizando GlnB como GlnK, enquanto que MucR IV e V foram isolados apenas em experimentos utilizando GlnK. Estas 5 proteínas possuem tamanho entre 15,4 a 17,4 kDa, e possuem em média 43,9% de identidade entre si na sua sequência de aminoácidos. MucR I a IV possuem uma identidade bastante homogênea entre si: 52,6% (com desvio padrão de 3,2%), enquanto que MucV

se difere mais, apresentando em média 30,9% de identidade com os demais. A análise do sequenciamento genômico de *A. amazonense* revelou a presença de pelo menos 6 reguladores transcricionais do tipo MucR distribuídos pelo genoma, de forma aparentemente aleatória. Todos estes apresentam o domínio conservado PF05443 do banco de dados Pfam, característico da família ROS/MUCR, que descreve 132 resíduos de aminoácidos. Buscas por BLAST no banco de dados não redundante do NCBI revelam que MucR II, IV e V apresentam maior homologia com um dos dois reguladores MucR de *Rhodospirillum centenum* SW, enquanto que MucR III apresenta maior homologia com a outra cópia. Já MucR I apresenta maior homologia com um dos três reguladores MucR de *Caulobacter segnis* ATCC 21756, e MucVI, que não foi isolado nos experimentos de *pull-down*, se assemelha mais a um dos três reguladores MucR de *Granulibacter bethesdensis* CGDNIH1. O número expressivamente maior de parálogos deste regulador em *A. amazonense*, quando comparado aos organismos que apresentam proteínas de maior homologia, e o fato de pelo menos cinco deles serem expressos nas mesmas condições são achados no mínimo intrigantes. Análise do sequenciamento genômico parcial de *A. brasilense*, que ainda não se encontra disponível no banco de dados do NCBI, revela que esta bactéria também possui 6 genes codificantes para reguladores transcricionais MucR, também distribuídos pelo genoma.

Reguladores MucR foram melhor caracterizados no diazotrófico simbiote *Sinorhizobium meliloti*. Nesse, MucR foi descrita como um proteína contendo um domínio *zinc finger* do tipo C2H2 que apresenta 80% de identidade com o regulador transcricional Ros de *Agrobacterium tumefaciens* (KELLER *et al.*, 1995). Ros controla a expressão de diferentes genes de virulência do plasmídeo Ti ao se ligar a uma sequência consenso (LEIGH & WALKER, 1994) chamada de *ROS box*, sendo necessário também para a produção de succinoglicano em *A. tumefaciens* (COOLEY *et al.*, 1991). Já MucR de *S. meliloti* influencia a composição da matriz de exopolissacarídeos (EPS), fator chave no estabelecimento da sua simbiose com plantas. Sabe-se que *S. meliloti* pode produzir dois tipos de EPSs acídicos, o succinoglicano (EPS I) é necessário para a simbiose com suas plantas hospedeiras, e galactoglicano (EPS II), que pode substituir o succinoglicano na simbiose com pelo menos alfafa (GLAZEBROOK & WALKER, 1989; LEIGH & WALKER, 1994). A produção de um ou outro EPS depende das concentrações ambientais de fosfato, sendo controlada por pelo menos três reguladores transcricionais, entre eles MucR. Este último atua ativando a produção de succinoglicano e inibindo a síntese de galactoglicano, ao se ligar às

regiões promotoras de ambos *clusters* de genes de biossíntese de EPS (BERTRAM-DROGATZ *et al.*, 1998; BAHLAWANE *et al.*, 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que MucR está relacionado também ao controle da motilidade em *S. meliloti*, já que este se liga à região promotora e inibe a expressão do gene *rem*, que codifica para uma proteína ativadora dos genes de motilidade (BAHLAWANE *et al.*, 2008). O mecanismo exato de regulação da atividade de MucR permanece desconhecido (BAHLAWANE *et al.*, 2008).

É importante ressaltar, no entanto, que *Azospirillum* se difere de *Sinorhizobium* pelo fato de não estabelecer simbiose em nódulos de plantas. A produção de EPS em *Azospirillum*, além de exercer importantes papéis estruturais, como permitir a adesão à superfícies, promover a aquisição de nutrientes e proteção à agressões ambientais (GONZALEZ *et al.*, 1996), também possui relação com o fenômeno de floculação. A intensidade de agregação de diferentes linhagens de *A. brasilense*, variantes na sua capacidade de agregação, demonstrou correlação com diferenças tanto quantitativas como qualitativas no conteúdo de EPS das células (BURDMAN *et al.*, 1998; BURDMAN, 2000). Em *A. brasilense*, sugere-se que essa propriedade de formar agregados e flocular pode afetar positivamente a sua dispersão e sobrevivência no solo (NUR *et al.*, 1981; SADASIVAN & NEYRA, 1985). Já está bem estabelecido que variações na proporção da oferta nutricional de carbono e nitrogênio têm influência sobre esse fenômeno: meios ricos com taxa C:N baixa tendem a promover um modo de crescimento dispersivo, enquanto que em meios com taxa C:N alta as células tendem a agregar flocular (SADASIVAN & NEYRA, 1985; DEL GALLO *et al.*, 1989).

A disponibilidade de C e N, que na célula se reflete pelos níveis de 2-oxoglutarato e glutamina, é o principal sinal regulatório das proteínas PII. Portanto, estas poderiam estar envolvidas no processo de floculação, através da regulação do conteúdo de EPS celular. De acordo, os cultivos de *A. amazonense* mantidos por 3h em meio desprovido de fonte de nitrogênio, utilizados para a extração de proteínas para os experimentos de *pull-down*, apresentaram viscosidade aumentada em relação aos cultivos com nitrogênio. Proteínas MucR foram isoladas apenas na condição sem nitrogênio, onde a taxa de C:N é alta. No entanto, ainda carecemos de conhecimento sobre os mecanismos de regulação de MucR, e qual a sua função em *Azospirillum*.

O regulador transcricional da família MarR também foi encontrado em ambos experimentos de *pull-down* utilizando o extrato referente a condição de ausência de nitrogênio fixado, com GlnB ou GlnK como proteína isca. Essa proteína de 22 kDa

possui o domínio estrutural *helix-turn-helix* (HTH, ou hélice-volta-hélice) tipo MarR (PDOC00861 no Prosite, ou PF01047 no Pfam). O regulador transcricional MarR de *E. coli*, que dá nome a família, é um repressor transcricional que regula a expressão do operon *mar* (*multiple antibiotic resistance*), responsável pelo controle de genes de resistência a diversos antibióticos (SULAVIK *et al.*, 1995). Um grande número de compostos induz a transcrição do operon *mar*. Essa regulação se dá através da ligação de compostos aniônicos e lipofílicos (geralmente fenólicos) à proteína MarR, o que reduz a sua habilidade em se ligar às suas sequências de DNA cognatas (WILKINSON & GROVE, 2006). Outro membro prototípico da família é SlyA de *Salmonella typhimurium*, um regulador transcricional necessário para a virulência e sobrevivência dessa bactéria em macrófagos (LINEHAN *et al.*, 2005). Proteínas do tipo MarR/SlyA são bem distribuídas entre bactérias e arqueas e estão implicadas em diversas funções biológicas, entre elas a resistência a antibióticos, solventes orgânicos, desinfetantes domésticos, agentes de estresse oxidativo e regulação da síntese de fatores de virulência (em patógenos de humanos e plantas) (ALEKSHUN & LEVY, 1999).

Já os reguladores transcricionais da família XRE e TetR foram encontrados apenas no experimento de *pull-down* de GlnK com extrato referente a falta de nitrogênio. A exemplo de MarR, as famílias aos quais esses reguladores transcricionais pertencem são definidas pelo domínio estrutural hélice-volta-hélice presente. O regulador transcricional da família XRE demonstra a presença de um domínio hélice-volta-hélice que recebe diferentes denominações em cada banco de dados de referência: domínio HTH da família de reguladores transcricionais do tipo XRE (*xenobiotic response element*, elemento de resposta a xenobióticos, código cd00093 do CDD) domínio HTH do tipo Cro/C1 (código PDOC50943 do Prosite) ou simplesmente domínio HTH 3 (código PF01381 do Pfam). De fato, esse domínio é característico de uma família que comporta uma gama de reguladores transcricionais com funções diferentes. Além dos protótipos Cro e C1 dos bacteriófagos 434 e Lambda, respectivamente, que estão envolvidos no controle do ciclo lítico, também se pode citar o repressor de esporulação SinR de *Bacillus subtilis*, o regulador dos genes de síntese de NAD NadR de *E. coli*, a proteína específica da fase vegetativa H7 de *Dictyostelium discoideum*, entre outros vários. Já a família de reguladores transcricionais TetR tem como protótipo o repressor de tetraciclina encontrado no transposon Tn10 e em alguns plasmídeos de enterobactérias. O domínio HTH do tipo TetR (PDOC00830 do Prosite ou PF00440 do Pfam) é encontrado em diversos reguladores transcricionais

bacterianos envolvidos muitas vezes com transporte transmembrana e permeabilidade do envelope celular. Além do domínio estrutural HTH do tipo TetR, o regulador transcricional encontrado em nossos experimentos também apresenta o domínio PF08362 do banco de dados Pfam, que compreende a uma região carboxi-terminal que serve como uma assinatura adicional para a família TetR.

O regulador transcricional da família RegA, por sua vez, foi encontrado no experimento de *pull-down* de GlnK com extrato referente à condição de abundância de nitrogênio fixado. Essa proteína possui 90% de identidade e 97% de similaridade na sua sequência de aminoácidos com a proteína reguladora do aparato fotosintético RegA de *Rhodospirillum centenum* SW. O regulador isolado apresenta o domínio conservado de resposta regulatória (CDD cd00156, Prosite PDOC50110 ou Pfam PF00072), também chamado de domínio receptor, característico de sistemas de transdução de sinal de dois componentes, como por exemplo NtrB/NtrC. Esses sistemas são compostos por uma histidina cinase sensora (HC) e o regulador de resposta (RR) cognato (comumente um fator transcricional). A HC responde a sinais ambientais catalisando a sua autofosforilação e transferência do grupamento fosfato para o domínio receptor do RR, que por sua vez tem sua função alterada mediante fosforilação, causando uma resposta celular que muitas vezes corresponde à regulação da transcrição. Algumas bactérias contêm até 200 sistemas de dois componentes altamente regulados (LAUB & GOULIAN, 2007). O regulador transcricional tipo RegA encontrado em nossos experimentos está localizado a montante de um gene homólogo para a histidina cinase RegB, indicando que estes formam um sistema de dois componentes.

RegB e RegA foram originalmente descritos como membros cognatos de um sistema regulatório de dois componentes envolvido na síntese anaeróbica do fotosistema em *Rhodobacter capsulatus* (MOSLEY *et al.*, 1994; SGANGA, 1992). No entanto, atualmente se sabe que estas proteínas constituem um sistema regulatório global altamente conservado que fornece um nível sobrejacente de controle redox sobre uma variedade de processos biológicos geradores ou utilizadores de energia. Especificamente, fotossíntese, fixação de carbono, fixação de nitrogênio, oxidação de hidrogênio, denitrificação, respiração aeróbica e anaeróbica, transporte de elétrons e aerotaxia fazem parte atualmente do regulon RegB/RegA (ELSEN *et al.*, 2004). Estudos genômicos identificaram homólogos de RegB e RegA altamente conservados em várias outras espécies fotossintéticas e não fotossintéticas de α - e γ -Proteobactérias (ELSEN *et al.*, 2004). Além de apresentarem um nível alto de similaridade de sequência, eles

apresentam similaridade funcional. Por exemplo, Emmerich *et al.* (2000) demonstraram que os homólogos RegB e RegA de *R. capsulatus*, *B. Japonicum* e *S. meliloti* são intercambiáveis.

Particularmente interessante é o envolvimento destas proteínas no sistema de fixação do nitrogênio. Essa relação foi descoberta originalmente em *Rhodobacter sphaeroides*, ao se observar que a síntese do complexo enzimático nitrogenase estava desreprimida na presença de excesso de amônia em linhagens que não apresentavam uma via de fixação de CO₂ funcional. Os autores alegaram que a fixação de CO₂ normalmente funciona como uma válvula de escape de elétrons (*electron sink*) que serve para dissipar o excesso de equivalentes redutores gerados pelo crescimento fotoheterotrófico. Na ausência de fixação de CO₂, os autores cogitaram que a nitrogenase se torna desreprimida para servir como um elemento alternativo de dissipação de elétrons. Interessantemente, uma proteína RegB funcional é necessária para a desrepressão da nitrogenase na ausência da fixação de carbono (JOSHI & TABITA, 1996).

O estudo de Elsen *et al.* (2000) contribuiu para o entendimento do mecanismo de desrepressão da nitrogenase em *R. capsulatus* ao mostrar que o sistema RegB/RegA controla indiretamente a expressão do operon *nifHDK*, que codifica para o complexo enzimático da molibdo-nitrogenase (que utiliza molibdênio como cofator). Em *R. capsulatus*, assim como em várias outras bactérias, o sistema de dois componentes NtrB/NtrC controla a expressão do fator transcricional NifA, que ativa a expressão de diversos genes *nif*, entre eles *nifHDK*. Em *R. capsulatus*, existem duas cópias funcionais de *nifA*, *nifA1* e *nifA2*, ambas codificando proteínas capazes de ativar a expressão de *nifHDK*. Foi demonstrado que RegA se liga ao promotor de *nifA2* entre dois sítios em tandem de ligação a NtrC e as sequências promotoras -10 e -35. É importante ressaltar, porém, que como demonstrado anteriormente, NtrC é absolutamente necessário para a expressão de *nifA2* (FOSTER-HARTNETT & KRANZ, 1992), indicando que RegA (fosforilado) por si só não é suficiente para estimular a expressão de *nifA2*. Consequentemente, o envolvimento de RegA na síntese da nitrogenase parece representar um nível sobressalente de regulação responsiva ao estado redox da célula, que se soma à regulação dependente dos níveis de nitrogênio exercida por NtrC.

O envolvimento de RegB/RegA no controle da fixação de nitrogênio também foi observado na bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. Nessa bactéria, os homólogos de RegB/RegA (chamados de RegS/RegR) são necessários para a expressão aeróbia e

anaeróbia do operon *fixR-nifA*. Uma mutação que inativa o regulador RegR reduz a expressão de *fixR* e *nifA* e, conseqüentemente, reduz a fixação do nitrogênio. No entanto, um fenótipo relacionado não foi observado quando a cinase RegS foi inativada. Mutantes RegR de *B. japonicum* formam nódulos simbióticos com raízes de plantas, mas os nódulos não apresentam a capacidade de fixar nitrogênio. Adicionalmente, análise por microscopia eletrônica demonstrou que a linhagem com RegR inativada falhou em produzir bacterioides, que são células de *B. japonicum* em um estado diferenciado, que fixa nitrogênio (BAUER *et al.*, 1998).

Interessantemente, um estudo de duplo-híbrido em levedura utilizando RegA de *Rhodobacter capsulatus* como proteína isca demonstrou a interação de RegA com a proteína NtrX, o elemento regulador de resposta do sistema de dois componentes NtrY/NtrX, cujos genes codificantes estão localizados logo a jusante do operon *nifR3-ntrBC*. Essa interação foi inclusive confirmada por métodos *in vitro* (GREGOR *et al.*, 2007). O sistema NtrY/NtrX está envolvido na regulação da fixação do nitrogênio em *Azorhizobium caulinodans* (controlando a expressão de *nifA*) (PAWLOWSKI *et al.*, 1991) e na regulação de assimilação de nitrato em *A. brasilense* (ISHIDA *et al.*, 2002), mas a sua função não havia sido investigada em *R. capsulatus*. Esse estudo demonstrou que NtrX está envolvida na repressão dos operons do aparelho fotossintético, mas não analisou o seu envolvimento na fixação do nitrogênio (GREGOR *et al.*, 2007). Além disso, outro estudo demonstrou que enquanto mutantes inativados para *ntrB* ou *ntrY* eram capazes de fixar nitrogênio, mutantes duplos para *ntrB/ntrY* não o faziam (assim como o mutante para *ntrC*). Esses dados sugerem que as histidinas cinases NtrB e NtrC podem substituir uma a outra como fosfodoadores para o regulador NtrC em *R. capsulatus* (DREPPER *et al.*, 2006). De forma semelhante, em *A. brasilense* também foi descrito que o operon *ntrXY* reestabeleceu a capacidade de crescimento dependente de nitrato de uma linhagem de *A. brasilense* apresentando o operon *nifR3ntrBC* deletado (ISHIDA *et al.*, 2002).

Todas essas evidências demonstrando o *cross-talk* do sistema redox RegB/RegA com outros sistemas regulatórios em diversas α -Proteobactérias, especialmente com aqueles relacionados ao metabolismo de nitrogênio e carbono, estimulam a noção de que a sinalização por PII poderia estar sendo submetida a esse outro nível de regulação. RegA e PII poderiam estar relacionadas de diversas maneiras. Por exemplo, se as observações feitas para *R. capsulatus* forem verdadeiras também em *Azospirillum*, RegA poderia estar interagindo com NtrX, que poderia se associar a NtrB, que é alvo

direto de PII (embora não tenhamos encontrado essas duas proteínas intermediárias em nossos experimentos). Já que NtrX possui uma estrutura bastante similar a reguladores do tipo NtrC, alternativamente RegA poderia estar ligando a NtrC, que se liga a NtrB, que se liga a PII. Até o momento, não existem estudos funcionais das proteínas RegB e RegA em *Azospirillum*, que representam um campo de investigação bastante fértil.

O fator transcricional da família Fur foi identificado no experimento de *pull-down* de GlnB com extrato referente à ausência de nitrogênio, e possui forte homologia com a proteína regulatória da captação de zinco de *Rhodospirillum centenum* SW (73% de identidade, 84% de similaridade na sequência de aminoácidos). Este regulador apresenta o domínio PF01475 do banco de dados Pfam (ou cd07153 no banco de dados CDD do NCBI), chamado de Fur (*ferric uptake regulator*, ou regulador de captação de ferro). Esse domínio é característico de uma família de reguladores de captação de metais, ubíquos entre bactérias Gram-negativas, que se ligam a sequências operadoras no DNA e controlam a transcrição de genes responsivos a íons de metal. O protótipo da família, Fur, funciona como um regulador global da homeostase de ferro, controlando ambos processos de indução de sistemas de captação de ferro (em condições de limitação de Fe) e de expressão de proteínas de armazenamento e de enzimas utilizadoras de ferro (em condições de suficiência de Fe), podendo atuar como um repressor ou como um ativador transcricional, dependendo da região regulatória em que atua. Sabe-se atualmente que existe uma grande diversidade na seletividade para o metal e na função biológica dentro da família Fur, que compreende também reguladores dependentes de outros metais como zinco (Zur), manganês (Mur) e níquel (Nur) (LEE & HELMANN, 2007). A proteína Zur de *E. coli* reprime a expressão de um transportador do tipo ABC de captação de zinco (ZnuABC), através da sua ligação à região promotora bidirecional de *znuA* e *znuCB* (PATZER & HANTKE, 2000).

5.1.2 Proteínas do metabolismo de metais

Além do regulador da captação de zinco já mencionado, outras duas proteínas envolvidas no metabolismo de metais foram encontradas em nossos experimentos de *pull-down*. Ambas foram isoladas utilizando GlnK como proteína isca; a proteína relacionada a biossíntese de sideróforos a partir do extrato referente à falta de nitrogênio e a proteína contendo a região de ligação à cátion de hemeritina a partir do extrato de abundância de nitrogênio.

A primeira apresenta 55% de identidade e 64% de similaridade na sequência de aminoácidos com a proteína YP_841196.1 (proteína relacionada à biossíntese de sideróforo/acetiltransferase ou N-acetilase de proteínas ribossômicas) de *Ralstonia eutropha* H16. A proteína encontrada possui o domínio Pfam PF10331 característico da família AlcB, que descreve uma região de 45 resíduos de uma das proteínas da via de síntese de alcaligina em *Bordetella* e aerobactina em *E. coli* e outras bactérias. Enquanto que muitos sideróforos bacterianos são sintetizados a partir da família multienzimática NRPS de sintetases de peptídeos não ribossômicos (*nonribosomal peptide synthetase*), alcaligina, aerobactina e alguns outros sideróforos (como rizobactina, acromobactina, vibrioferrina e deferrioxamiona) são sintetizados por uma via chamada de via independente de NRPS, que carece de estudos quando comparada com a via clássica NRPS. De fato, o mecanismo exato de ação de AlcB ainda não se encontra bem estabelecido, se catalisa uma acilação do intermediário N-hidroxiputrescina com ácido succínico, ou se catalisa uma acilação com succinil-CoA (CHALLIS, 2005).

Já a proteína contendo a região de ligação à cátion de hemeritina HHE foi anotada como tal devido a sua forte homologia com a proteína YP_001683049.1 (*hemerythrin HHE cation binding region protein*) de *Caulobacter* sp. K31, com a qual apresenta 84% de identidade e 93% de similaridade na sequência de aminoácidos. No entanto, buscas nos bancos de dados de domínios conservados CDD, Prosite e Pfam não identificaram a presença de nenhum domínio conservado na proteína de *A. amazonense*. Busca similar para a proteína homóloga YP_001683049.1 indicou a presença do domínio hemeritina HHE de ligação a cátion (PF01814) do banco de dados Pfam, porém com *score* estatisticamente insignificante. Assim, a atribuição de função destas proteínas deve ser analisada com cuidado, dada a natureza especulativa de sua anotação.

O domínio HHE (Histidina-Histidina-Glutamato), descrito por estudos bioinformáticos do genoma de *Streptomyces coelicolor*, contém cerca de 70 resíduos e provavelmente é composto por 2 α -hélices. Os dois resíduos de histidina, ambos no meio das hélices preditas, e o resíduo de glutamato conservados são sugestivos de um sítio de ligação à cátions, como o sítio de ligação de Zn^{2+} da carboxipeptidase A (YEATS *et al.*, 2003). Posteriormente, descobriu-se que esse domínio está relacionado a proteínas hemeritinas. A família das hemeritinas é composta por proteínas hemeritina encontradas em invertebrados e por uma gama de homólogos de bactérias e arqueas. A hemeritina é uma proteína de ligação a oxigênio encontrada no sistema vascular e no líquido celômico, ou em músculos de invertebrados, possuindo funções similares à

hemoglobina e à miohemoglobina de vertebrados. Nessas proteínas, o oxigênio é ligado a um centro de ferro (não heme) constituído de dois átomos de ferro ligados a um grupo característico de resíduos de histidina:aspartato e glutamato. Já em eucariotos a diversidade de proteínas contendo domínio do tipo hemeritina é grande, existindo, no entanto, escassos estudos de caracterização experimental dessas proteínas. Já que o domínio HHE se liga a ferro, que permite a ligação de oxigênio, foi proposto que essas proteínas poderiam desempenhar funções de percepção, estocagem ou detoxificação de oxigênio ou de ferro (FRENCH *et al.*, 2008).

Existe uma série de observações pontuais que relaciona proteínas PII com o metabolismo de metais. A mais evidente destas foi a descrição, por estudos bioinformáticos, de um novo grupo de proteínas PII putativas, situadas em ilhas de resistência a metais, mais comumente junto ao operon *czcCBA*, que codifica para um transportador de metais como Co^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} , em algumas linhagens bacterianas pontuais de quase todos os grupos de Proteobactérias (mas nenhuma do gênero *Azospirillum*) (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Adicionalmente, um estudo recente descreve que o gene *glnB* de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 está organizado em operon com os genes *qseEGF* (*quorum sensing E. coli*), que codificam para o sistema de dois componentes QseE (cinase sensora de epinefrina, sulfato e fosfato) e QseF (regulador transcricional de promotores sigma 54), e para QseG, uma proteína de membrana envolvida na translocação de uma proteína efetora pelo sistema de secreção do tipo III. O estudo de mutantes para cada um desses três genes revelou que, embora os experimentos de microarranjo demonstrem que QseEFG regulam vários genes envolvidos na utilização de nitrogênio, as linhagens mutantes não se revelaram deficientes na utilização desse elemento. A inativação dessas proteínas, no entanto, exerceu um efeito pequeno, mas significativo, na captação de ferro (READING *et al.*, 2010). Isso evidencia que, mesmo que a associação transcricional de PII com esses genes seja fortuita, existe uma relação entre a regulação por sigma 54 - que controla a transcrição de genes do metabolismo de nitrogênio - e o metabolismo de ferro.

Outra relação interessante entre PII e o metabolismo de metais é a marcante similaridade estrutural de PII com proteínas CutA, embora elas apresentem uma homologia de sequência no máximo aleatória. CutA é uma proteína de aproximadamente 12kDa encontrada em bactérias, plantas e animais, incluindo humanos. Ela foi originalmente identificada no locus *cutA* de *E. coli*, envolvido em tolerância a metais divalentes (FONG *et al.*, 1995). CutA de *E. coli* é capaz de se ligar a

um íon Cu(II) em um sítio estruturalmente equivalente ao sítio de ligação a ATP das proteínas PII (ARNESANO *et al.*, 2003; XU *et al.*, 1998). Arnesano *et al.* (2003) sugeriram que CutA de *E. coli* poderia exercer papel sensorial/regulatório, atuando de forma a diminuir as concentrações de cobre na célula pela ligação direta ao cobre, ou pela modulação da exportação/importação de íons cobre através de sua ligação com transportadores de membrana, ou então por ambos mecanismos.

Outra evidência inesperada da relação de PII e a captação de ferro surgiu da caracterização de um mutante de *glnD* (que codifica a UTase/UTr que uridila PII em condições de falta de nitrogênio) de *Vibrio fischeri*, que apresentou uma redução inesperada na produção sideróforos e na capacidade de multiplicação das células em condições de limitação de ferro na ausência de GlnD, em adição ao fenótipo esperado de redução da eficiência na utilização de nitrogênio. Os autores acreditam que a deficiência na captação de ferro, mais do que a dificuldade na utilização de nitrogênio, diminuiu o tempo de persistência de *V. fischeri* mutante na colonização do órgão emissor de luz da lula havaiana (*Euprymna scolopes*), seu hospedeiro habitual. Dois mecanismos foram propostos para a interferência de GlnD na captação de ferro: a ausência de atividade da UTase/UTr no mutante poderia afetar a produção de um metabólito intermediário necessário à síntese de sideróforos ou então à transcrição de genes de síntese ou de recaptção de sideróforos (GRAF & RUBY, 2000). Alternativamente, também se deve considerar a possibilidade da função dos sideróforos estar diminuída no mutante de *glnD* devido à modificação de um aspecto da fisiologia geral da bactéria, como a produção de ácidos ou a estocagem de nutrientes inorgânicos (GRAF & RUBY, 2000; RAE *et al.*, 1997; ULT-RICHÉ *et al.*, 1998). Ainda não existem estudos estabelecendo um mecanismo direto de relação de PII e o metabolismo de metais.

5.1.3 Enzimas metabólicas

Ao todo, 12 proteínas isoladas em nossos experimentos de *pull-down* foram anotadas como enzimas metabólicas. Duas dessas representam subunidades diferentes da mesma enzima (piruvato desidrogenase), isoladas em experimentos independentes. Algumas destas enzimas devem ser analisadas com cuidado, pois podem representar proteínas abundantes na célula, o que as tornaria mais propensas a aparecerem como contaminantes nos experimentos. No entanto, a falta de estudos proteômicos em

Azospirillum dificulta essa análise. Notadamente, entre as enzimas de *A. amazonense* isoladas, a ATP sintase F1 (subunidade delta), isolada de *pull-down* utilizando GlnB com extrato de falta de nitrogênio, poderia ser uma proteína contaminante, já que um estudo proteômico do tipo *shotgun* de *Rhodospirillum rubrum*, uma bactéria da mesma família de *Azospirillum*, identificou a subunidade beta dessa enzima como uma das 10 proteínas de maior abundância celular (em condições basais, utilizando a metodologia emPAI para análise de abundância) (MASTROLEO *et al.*, 2009). No entanto, um estudo proteômico comparativo dessa mesma bactéria, utilizando géis bidimensionais, identificou a subunidade beta da ATP sintase F1 como uma proteína mais expressa em condições de abundância de nitrogênio, comparativamente a condições de fixação de nitrogênio (SELAO *et al.*, 2008). Análise visual dos géis bidimensionais apresentados nesse estudo indica que esta não seria uma proteína acentuadamente mais representada do que as demais, especialmente em condições de fixação de nitrogênio. Assim, fica evidente a dificuldade em prever se as informações obtidas para outras bactérias por abordagens diferentes seriam válidas também para o nosso delineamento experimental.

A Tabela 5.2 apresenta as enzimas encontradas em nossos experimentos juntamente com a sua atribuição funcional, de acordo com o banco de dados de vias metabólicas KEGG. Três enzimas foram identificadas em mais de um experimento: acetolactato sintase nos experimentos de *pull-down* de GlnB e GlnK com extrato referente a condição de abundância de nitrogênio, GTP ciclodrolase I com ambas proteínas isca e extrato de limitação de nitrogênio e piruvato desidrogenase (componente E1) utilizando GlnK com os extratos das duas condições (embora tenha-se identificado subunidades diferentes dessa enzima em cada experimento).

TABELA 5.2 Enzimas metabólicas encontradas nos experimentos de *pull-down*.

Enzima	ID/experm. ^a	Via metabólica ^b	Função geral ^c
leucil aminopeptidase PepA	2/GlnB N+	KEGG 00480: Metabolismo de glutatona	Metabolismo de outros aminoácidos
frutose-bisfosfato aldolase	3/GlnB N+	KEGG 00051: Metabolismo de fucose e manose KEGG 00010: Glicólise/ Gliconeogênese KEGG 00030: Via da pentose fosfato	Metabolismo de carboidratos

frutose-1 6-bisfosfatase	4/GlnB N+	KEGG 00562: Metabolismo de inositol fosfato KEGG 00521: Biossíntese de streptomina	Metabolismo de carboidratos Biossíntese de metabólitos secundários
acetolactato sintase, subunidade menor	5,8/GlnB N+ 19/GlnK N+	KEGG 00650: Metabolismo de butanoato KEGG 00660: Metabolismo dos ácidos C5-ramificados KEGG 00770: Biossíntese de pantotenato e CoA KEGG 00290: Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	Metabolismo de carboidratos Metabolismo de cofatores e vitaminas Metabolismo de aminoácidos
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tipo I	8/GlnK N-	KEGG 00010: Glicólise/ Gliconeogênese	Metabolismo de carboidratos
GTP ciclohrolase I	7/GlnB N- 16/GlnK N-	KEGG 00790: Biossíntese de folato	Metabolismo de cofatores e vitaminas
ATP sintase F1, subunidade delta	13/GlnB N-	KEGG 00190: Fosforilação oxidativa	Metabolismo de energia
piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	8/GlnK N+	KEGG 00650: Metabolismo de butanoato KEGG 00020: Ciclo do citrato (ciclo TCA) KEGG 00010: Glicólise/ liconeogênese KEGG 00620: Metabolismo de piruvato KEGG 00290: Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	Metabolismo de carboidratos Metabolismo de aminoácidos
amidofosforibosiltransferase	9/GlnK N+	KEGG 00250: Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato KEGG 00230: Metabolismo de purina	Metabolismo de aminoácidos Metabolismo de nucleotídeos
manose-1-fosfato guanililtransferase	10/GlnK N+	KEGG 00520: Metabolismo de açúcares amino e nucleotídicos KEGG 00051: Metabolismo de frutose e manose	Metabolismo de carboidratos
dihidrolipoil desidrogenase (componente E3 dos complexos piruvato e 2-oxoglutarato desidrogenases)	3/GlnK N-	KEGG 00020: Ciclo do citrato (ciclo TCA) KEGG 00260: Metabolismo de glicina, serina e treonina KEGG 00010: Glicólise/ Gliconeogênese KEGG 00620: Metabolismo de piruvato KEGG 00280: Degradação de valina, leucina e isoleucina	Metabolismo de carboidratos Metabolismo de aminoácidos

		KEGG 00650: Metabolismo de butanoato	
		KEGG 00020: Ciclo do citrato (ciclo TCA)	
piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade alfa	7/GlnK N-	KEGG 00010: Glicólise/ Gliconeogênese	Metabolismo de carboidratos Metabolismo de aminoácidos
		KEGG 00620: Metabolismo de piruvato	
		KEGG 00290: Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	

^a ID: identificação de acordo com as indicações nas Figuras 4.6 a 4.8 e nas Tabelas 4.1 a 4.4. Experim.: proteína isca (GlnB ou GlnK) e extrato proteico (condição de abundância (N+) ou limitação (N-) de nitrogênio) utilizados no experimento de *pull-down*.

^b Via metabólica: vias metabólicas do banco de dados KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - <http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) as quais a enzima pertence.

^c Função geral atribuída segundo a hierarquia do banco de dados KEGG.

N.D.: Não definido - enzima sem designação no banco de dados KEGG.

A Tabela 5.2 revela que a maioria das enzimas, 7 das 11 encontradas, tem função relacionada ao metabolismo de carboidratos. Também é notável o número de proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos (6 enzimas), que possui uma relação direta com o aproveitamento do nitrogênio celular. Nossa abordagem experimental permite o isolamento de complexos multiproteicos, o que significa que as proteínas isoladas podem representar proteínas indiretamente relacionadas à PII, que estabelecem interação com os seus alvos celulares ou mesmo com as proteínas de interação destes. Também não está descartada a possibilidade de interagirem com as proteínas ribossômicas contaminantes.

Nesse contexto, é interessante ressaltar que a análise das proteínas diferencialmente expressas em condições de abundância de nitrogênio comparativamente a condições de fixação de nitrogênio na bactéria *R. rubrum* revelou que várias proteínas relacionadas com o metabolismo de carbono são reguladas de acordo com a disponibilidade de nitrogênio, evidenciando a importância de um sistema de *cross-talk* entre esses sinais celulares. Segundo os dados desse estudo, células experienciando níveis altos de nitrogênio fixado terão níveis maiores de proteínas envolvidas no metabolismo de carbono, o que pode ser interpretado como uma resposta celular cuja finalidade é equilibrar o estado redox da célula. A mesma tendência de expressão foi observada para proteínas do metabolismo de aminoácidos (SELAO *et al.*, 2008). Das 11 enzimas isoladas em nossos experimentos de *pull-down*, 4 são homólogas a proteínas presentes na lista de 44 proteínas caracterizadas como diferencialmente expressas em função da disponibilidade de nitrogênio em *R. rubrum*: acetolactato sintase, frutose-1 6-bisfosfatase, ATP sintase F1 e leucil aminopeptidase. Todas essas se

apresentaram mais representadas nos géis bidimensionais referentes à condição de abundância de nitrogênio de *R. rubrum* (SELAO *et al.*, 2008). De acordo, em nossos experimentos apenas a ATP sintase F1 foi isolada no *pull-down* de um extrato de *A. amazonense* referente à condição de falta de nitrogênio.

5.1.4 Transportadores

Duas proteínas anotadas como receptor dependente de TonB (I e II) foram isoladas em nossos experimentos de *pull-down*, apresentando 27,8% de identidade entre si na sequência de aminoácidos. Ambas apresentaram os domínios Pfam PF07715 e PF00593, que descrevem os elementos *plug* e barril destes receptores. O receptor dependente de TonB I foi encontrado em dois experimentos, GlnK com extrato N+ e GlnB com extrato N-, enquanto que o receptor dependente de TonB II foi isolado apenas de GlnB N-. Esses receptores são proteínas integrais da membrana externa que se ligam a substratos específicos com alta afinidade e realizam o transporte dependente de energia destes substratos para o espaço periplásmico, energia essa que é transduzida da força próton motiva da membrana citoplasmática pelo complexo enzimático TonB-ExbB-ExbD. A grande maioria de transportadores dependentes de TonB experimentalmente caracterizados até o momento está envolvida com a captação de complexos de ferro (com sideróforos, heme, hemoproteínas e afins) e de vitamina B12. No entanto, existem evidências que outras moléculas, algumas de tipos bastante diferentes, também possam ser ligadas/transportadas, como por exemplo maltodextrinas, sacarose, quito-oligosacarídeos, níquel, cobalto e cobre (SCHAUER *et al.*, 2008).

Dada a localização desses receptores, é altamente improvável que estabeleçam interação com as proteínas PII citoplasmáticas. A única possibilidade seria que PII (ou um de seus alvos) interagisse com um domínio citoplasmático do complexo de transporte dependente de TonB, localizado na membrana interna. É interessante ressaltar que alguns receptores de TonB adquiriram função sinalizatória, transduzindo um sinal externo através das duas membranas até o citoplasma. Esse tipo de transdutor dependente de TonB foi demonstrado interagir com um fator anti-sigma, localizado na membrana citoplasmática, que se liga e inibe a função do fator sigma ECF de função extracitoplasmática (ECF - *sigma factor of the extracytoplasmic function*) (KOEJNIK, 2005).

5.1.5 Proteínas de função diversa

Sete proteínas identificadas em nossos experimentos apresentaram funções bastante diversas das demais, e que portanto não se encaixaram em nenhum dos demais grupos funcionais propostos. No entanto, a maioria destas proteínas se assemelha quanto à característica de apresentar funções do tipo *housekeeping* - de manutenção e sustento da célula. Novamente neste caso deve-se tomar cuidado, pois devido à importância destas proteínas para os processos celulares basais, é possível que sejam proteínas abundantes, contaminantes nos experimentos de *pull-down*.

A chaperonina GroEL se destaca por ter sido isolada de pelo menos três experimentos de *pull-down*: GlnB N+, GlnB N- e GlnK N+. Como pode ser observado na Figura 4.9, o experimento de GlnK com extrato N- apresentou uma banda sugestiva forte no gel de SDS-APGE, na mesma altura que a banda correspondente a GroEL de GlnB N- (ambos foram aplicados paralelamente no mesmo gel). Surpreendentemente, na amostra referente a essa banda foi identificada com um bom grau de confiança apenas uma proteína de função desconhecida, da qual dispomos de sequência parcial no nosso banco de dados genômico de *A. amazonense*, o que significa que os *scores* obtidos poderiam ser ainda maiores caso tivéssemos conhecimento da sequência completa dessa proteína. Buscas realizadas no programa Mascot com parâmetros menos restritivas também não identificaram GroEL nessa amostra.

As chaperoninas representam uma subclasse das chaperonas moleculares, que são funcionalmente definidas pela sua habilidade em auxiliar o dobramento e/ou montagem de outras proteínas ou complexos proteicos *in vivo* sem representarem um componente da forma biologicamente ativa destas entidades (ELLIS & HEMMINGSEN, 1989; HARTL, 1996). GroEL, o protótipo do grupo das chaperoninas, atua interagindo de forma não covalente com uma gama de proteínas não dobradas ou parcialmente dobradas, e, juntamente com a co-chaperonina GroES, ajuda essas proteínas a atingir a sua conformação final, ativa. Estudos de co-imunoprecipitação combinados a espectrometria de massas identificaram cerca de 300 proteínas como substratos de GroEL de *E. coli*, sendo que destes aproximadamente 85 são substratos obrigatórios, ou seja, completamente dependentes de GroEL e GroES para o seu dobramento correto (HOURY *et al.*, 1999; KERNER *et al.*, 2005). Assim, a chaperonina de *A. amazonense* poderia estar interagindo com PII ou com várias outras proteínas retidas em nossos experimentos.

Embora chaperoninas sejam pleiotrópicas em sua função e atuem em uma variedade de substratos proteicos, o reconhecimento do seu papel em processos celulares específicos é obrigatório para o entendimento completo das bases bioquímicas e genéticas que permeiam esses processos (GOVEZENSKY *et al.*, 1991). Segundo a interpretação de Govezensky *et al.*, a chaperonina GroEL desempenha tanto papéis estruturais quanto regulatórios no sistema de fixação do nitrogênio de *Klebsiella pneumoniae*. Estes autores acreditam que um aspecto importante, mas muitas vezes negligenciado, no entendimento da biossíntese da nitrogenase é o papel de genes não-*nif* do hospedeiro nesse processo. Para endereçar tal questão, o processo de biossíntese da nitrogenase foi reconstruído no hospedeiro heterólogo *E. coli*, através de sua transformação com um plasmídeo contendo todo o cluster *nif* de *K. pneumoniae*. Comparando a montagem da nitrogenase em *E. coli* e *E. coli* mutante para *groEL*, foi verificado que esta era mais eficiente na linhagem selvagem. Mais do que pela assistência estrutural de GroEL no processo de montagem da nitrogenase, foi demonstrado que esta maior eficiência era resultante também de uma maior expressão dos genes *nif* na linhagem selvagem (GOVEZENSKY *et al.*, 1991). Diversas abordagens provaram que em *K. pneumoniae* GroEL é especialmente importante para a expressão de genes *nif* através do asseguramento do dobramento correto e da manutenção do estado funcional de NifA, uma proteína conhecidamente instável (GOVEZENSKY *et al.*, 1991; GOVEZENSKY *et al.*, 1994).

A importância de GroEL para a fixação do nitrogênio já foi demonstrada em várias bactérias, e fica evidenciada pelo fato de vários diazotróficos possuírem um número maior de genes *groEL* do que a maioria das bactérias (LUND, 2009). Além disso, em *Bradyrhizobium japonicum* um dos 5 operons *groESL* é co-regulado com os genes de fixação de nitrogênio, sendo ativado pela proteínas NifA em condições de baixas tensões de oxigênio a partir de um promotor dependente de sigma 54 (FISCHER *et al.*, 1993). Co-mutações desse gene e de outro gene *groEL* constitutivo reduziram a atividade de fixação de nitrogênio para 5% da atividade da linhagem selvagem. No entanto, esta diminuição foi atribuída à deficiência na montagem, e não na expressão, da nitrogenase (FISCHER *et al.*, 1999). Em *A. amazonense*, existem pelo menos 4 genes codificantes para chaperoninas GroEL, apresentando entre 60,3 e 89,9% de identidade entre si na sequência predita de aminoácidos. Curiosamente, um destes se encontra localizado próximo a genes reguladores do metabolismo de nitrogênio, estando à jusante e sendo separado por três genes do locus contendo *ntrBC* e *ntrYX*. No entanto,

não foi esse parálogo de GroEL que encontramos em nossos experimentos. Nas três amostras em questão, a mesma proteína GroEL foi identificada com alta confiança, juntamente com uma segunda proteína GroEL com *scores* inferiores. Análise cuidadosa dos dados revela que a maioria dos peptídeos identificados nessa segunda proteína são comuns à outra GroEL. Os poucos peptídeos únicos dessa segunda proteína apresentavam *scores* baixos, e por isso essa não foi incluída em nossos resultados.

O fator de terminação da transcrição Rho também foi encontrado em mais de um experimento, utilizando ambas as proteínas isca GlnB e GlnK com extrato N-. Uma vez que Rho atua no processo do término da transcrição de inúmeros genes, é provável que seja uma proteína abundante, podendo representar um contaminante nos experimentos. As demais proteínas foram encontradas somente em um experimento. Outras proteínas evidentemente *housekeeping* são o fator 2 de iniciação da tradução InfB (no experimento GlnK N+) e o fator de acoplamento transcrição-reparo (em GlnK N+).

Duas proteínas possuem apenas atribuições gerais quanto a sua função. Uma dessas é uma RNA metiltransferase da família TrmH, encontrada no *pull-down* utilizando GlnK com extrato N-. A família TrmH, definida pelo domínio Pfam PF00588, compreende metiltransferases envolvidas na metilação de ribose de tRNAs ou rRNAs. O protótipo dessa família é TrmH (ou SpoU em *E. coli*) que catalisa a transferência de um grupamento metila da S-adenosil-L-metionina para o 2'-OH da guanosina da ribose da posição 18 no loop D do tRNA (WATANABE *et al.*, 2005). A outra proteína, isolada de GlnB N+, é anotada como peptidase S10 serina carboxipeptidase. S10 é a designação da sua família no banco de dados de peptidases MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>), que toma como critério de classificação a tríade catalítica e a estrutura das peptidases. Segundo esse banco de dados, a família S10 compreende carboxipeptidases que utilizam serina como resíduo catalítico, e na maioria dos casos desempenham funções biológicas estruturais.

Por fim, também foi incluída no grupo de proteínas de funções diversas a proteína da família fasina, que foi isolada no *pull-down* de GlnB com extrato N-. Fasinas são proteínas de superfície que recobrem grânulos de estocagem de polihidroxialcanoatos (PHA), cujo tipo mais comum é o polihidroxibutirato (PHB). PHA são poliésteres lineares produzidos pela fermentação bacteriana com a função de estocagem de carbono e energia. A camada de fasinas estabiliza os grânulos, inibindo a sua coalescência, e previne a ligação inespecífica de outras proteínas na superfície hidrofóbica dos mesmos (NEUMANN *et al.*, 2008).

5.1.6 Proteínas de função desconhecida

Nos experimentos realizados foram encontradas 9 proteínas de função desconhecida. Para facilitar a sua distinção, elas foram numeradas em algarismos romanos, de acordo com a ordem em que foram encontradas nos experimentos de *pull-down*. Apenas três proteínas apresentaram homologia significativa com proteínas hipotéticas do banco de dados não redundante do NCBI, e por isso foram anotadas como proteínas conservadas de função desconhecida. Além disso, para 5 destas proteínas dispomos apenas de sequências parciais no banco de dados genômico de *A. amazonense*, o que dificulta as análises de inferência de função. Quatro proteínas se destacam por terem sido identificadas em mais de um experimento.

A Tabela 5.3 traz essas informações de forma detalhada, juntamente com os resultados de busca por domínios conservados nos bancos de dados Prosite e Pfam. É interessante ressaltar que a proteína de função desconhecida IV, encontrada em três experimentos, possui o domínio característico da família ProQ/FINO. Essa família inclui a proteína ProQ de *E. coli*, um ativador do osmosensor e transportador osmoregulatório ProP (KUNTE *et al.*, 1999), e o inibidor da fertilidade bacteriana FinO, uma proteína de ligação a RNA que reprime a transferência conjugativa de plasmídeos do tipo F (LEE *et al.*, 1992). No entanto, buscas por BLAST utilizando a sequência parcial que dispomos para a proteína de *A. amazonense* isolada revela que essa possui homologia com proteínas do banco de dados do NCBI somente na parte correspondente ao domínio ProQ/FinO. Portanto, anotamos esta proteína como proteína de função desconhecida. Situação idêntica acontece para a proteína de função desconhecida V: ela apresenta o domínio SH3 tipo 3, que corresponde à única região de homologia com proteínas conhecidas (analisando apenas a sequência parcial que dispomos). Domínios SH3 são amplamente distribuídos, mas a sua caracterização funcional ainda é bastante elusiva. Acredita-se que estes se ligam a proteínas ricas em prolina de forma a promover a formação de complexos proteicos específicos. Assim, estariam envolvidos em vários processos, tais como o aumento da concentração local de proteínas, a alteração de sua localização celular e a intermediação da montagem de grandes complexos multiproteicos (MORTON, 1994). Algumas proteínas conservadas de função desconhecida também apresentaram domínios descritos no banco de dados Pfam, porém não há informação funcional agregada a estes domínios.

TABELA 5.3 Proteínas de função desconhecida encontradas nos experimentos de pull-down.

	ID/Experim. ^a	Homologia com proteínas hipotéticas	Sequência completa no banco de dados	Domínios Prosite (e-value)	Domínios Pfam (e-value)
I	1/GlnK N+	Sim	Não	-	-
II	2/GlnK N+	Sim	Não	-	PF11974: Alpha-2-macroglobulin MG1 domain (1.4e-07)
III	6/GlnK N+ 4/GlnB N- 1/GlnK N-	Não	Não	-	-
IV	14/GlnK N+ 6/GlnB N- 11/GlnK N-	Não	Não	-	PF04352: ProQ/FINO family (8.9e-13)
V	18/GlnK N+ 11/GlnB N-	Não	Não	-	PF08239: Bacterial SH3 domain (2e-07)
VI	21/GlnK N+	Não	Sim	-	-
VII	18/GlnB N- 29/GlnK N-	Sim	Sim	-	-
VIII	12/GlnK N-	Sim	Sim	-	PF01709: Domain of unknown function DUF28 (3.7e-93)
IX	23/GlnK N-	Sim	Sim	-	PF07336: Protein of unknown function DUF1470 (2.6e-17) PF11706: CGNR zinc finger (2.5e-20)

^a ID: identificação de acordo com as indicações nas Figuras 4.6 a 4.8 e nas Tabelas 4.1 a 4.4. Experim.: proteína isca (GlnB ou GlnK) e extrato proteico (condição de abundância (N+) ou limitação (N-) de nitrogênio) utilizados no experimento de pull-down.

5.1.7 Proteínas ribossômicas

Foram encontradas 13 proteínas ribossômicas em nossos experimentos. Dada a sua abundância celular, e o fato de realizarem inúmeras interações entre si, geralmente são consideradas contaminantes em experimentos de isolamento de complexos proteicos por métodos bioquímicos. Mesmo assim, não está descartada a possibilidade de estabelecerem interações funcionais com proteínas PII ou com os alvos celulares destas.

Alguns estudos vêm relatando papéis regulatórios para determinadas proteínas ribossômicas. Por exemplo, estudos de pull-down utilizando como proteína isca a subunidade α da RNA Polimerase de *E. coli* identificaram como proteína específica de interação a proteína ribossômica L2, sendo essa interação confirmada por métodos de imunoprecipitação e duplo híbrido em levedura. Nesse estudo, foi demonstrado ainda que L2, mas não outras proteínas ribossômicas, é capaz de aumentar a expressão de um gene repórter regulado por um promotor específico de genes ribossômicos, o que aponta um papel regulatório transcricional para essa proteína (RIPPA *et al.*, 2010). Além de participar da montagem do ribossomo, várias proteínas ribossômicas têm sido implicadas em outras funções biológicas celulares. Um dos seus papéis melhor estudado

até o momento é a capacidade das proteínas ribossômicas de *E. coli* regularem a tradução do seu próprio mRNA multicistônico (ZENDEL & LINDAHL, 1994). Outras proteínas ribossômicas de *E. coli* (S4 e S10) demonstraram exercer função na antiterminação transcricional (TORRES *et al.*, 2001) ou, no caso de S9 e L14, estarem envolvidas no reparo e replicação de DNA (WOODGATE *et al.*, 1989; YANCEY & MATSON, 1991).

5.2 Uma terceira proteína PII em *Azospirillum amazonense*

Os genes codificantes para as proteínas PII GlnB e GlnK estudadas no presente trabalho foram isolados por métodos diversos: construção de bibliotecas genômicas parciais, PCR inverso, Site-Finding PCR e GenomeWalker. Essas metodologias permitiram o sequenciamento das regiões flanqueadoras desses genes, revelando que o gene *glnB* estava localizado a montante de um gene *glnA*, codificante para uma glutamina sintetase, como é comumente encontrado em Proteobactérias, enquanto que o gene *glnK* estava a montante de um gene *aat*, codificante para uma aspartato aminotransferase. Genes *glnK* geralmente estão organizados junto a um gene *amtB*, codificante para um transportador de amônia que tem sua atividade de transporte regulada pela proteína GlnK. Essa associação é conservada na grande maioria dos procariotos (SANT'ANNA *et al.*, 2009), sendo sugerido inclusive que essa associação seria uma das mais antigas da história biológica (THOMAS, 2000). No entanto, o fato do gene *glnK* de *A. amazonense* ser flanqueado por um gene *aat* e não *amtB* não representou novidade, pois uma organização gênica idêntica já havia sido descrita para o gene do tipo *glnK* de *A. brasilense*. O que nos surpreendeu recentemente foi a descoberta de um terceiro gene codificante para proteínas PII no sequenciamento genômico de *A. amazonense*. Esse terceiro gene está localizado logo a jusante de um gene *amtB*, e por isso é definido como *glnK*. Além disso, essa nova proteína GlnK apresenta 69% de identidade e 84% de similaridade na sequência de aminoácidos com a outra proteína GlnK de *A. amazonense*, enquanto que com a proteína GlnB a identidade é de 63% e a similaridade 80%. O fato de *A. amazonense* apresentar três proteínas PII, enquanto que *A. brasilense* apresenta duas, se soma às evidências de que essas duas espécies são distantes dentro do gênero *Azospirillum* e podem ter adquirido diferenças significativas quanto aos seus processos regulatórios. O perfil transcricional e as

sequências regulatórias do gene *glnK* recém descoberto deverão ser estudados em breve em nosso laboratório.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho aqui apresentado realizou um rastreamento geral dos alvos celulares diretos e das vias de regulação dos dois tipos de proteínas PII encontrados no modelo experimental *A. amazonense*. Diversas evidências sugerem que a regulação do metabolismo de nitrogênio de *A. amazonense* se diferencia da regulação das demais bactérias diazotróficas já caracterizadas, apresentando diferenças importantes inclusive quando comparada com a de *A. brasilense*. Em um ambiente altamente inconstante e competitivo como o solo, essas características diferenciais podem determinar o sucesso no estabelecimento dessas bactérias.

A partir dos experimentos realizados, aproximadamente 40 potenciais proteínas de interação (direta ou indireta) foram identificadas. Os resultados obtidos indicam que as proteínas PII poderiam representar um ponto de conexão com outros sistemas regulatórios, mais notadamente com o sistema de regulação do conteúdo de exopolissacarídeos e com o sistema de controle redox de processos energéticos.

A identificação de um número expressivo de enzimas metabólicas poderia ser interpretada de duas maneiras. Primeiramente, é plausível que alguma destas enzimas seja um alvo direto de PII, de forma semelhante ao que ocorre no plastídeo de *Arabidopsis thaliana*, onde PII interage com uma enzima que catalisa um passo chave na biossíntese de arginina (CHEN *et al.*, 2006). Segundo, a presença de diversas enzimas relacionadas ao metabolismo de carbono e/ou de aminoácidos poderia representar um reflexo das modificações do proteoma de *A. amazonense* referente às duas condições fisiológicas sob investigação. A comparação dos resultados obtidos para os dois extratos, abundância e privação de nitrogênio, poderia apontar diferenças importantes na expressão das proteínas identificadas. Mas mais do que isso, a metodologia empregada poderia estar revelando ainda mudanças na rede de interação dessas proteínas nesses dois momentos. Esse último cenário é válido também para a maioria das demais proteínas encontradas.

A metodologia escolhida é propensa à identificação de resultados falso-positivos. Portanto, faz-se necessário o uso de outros métodos de confirmação das interações mapeadas. No entanto, a metodologia padronizada nesse estudo ainda pode ser mais explorada, através da repetição dos experimentos com diferentes graus de stringência a fim de identificar os resultados mais consistentes. Além disso, já que a estrutura de PII responde à ligação de ATP e 2OG, podem-se comparar os resultados

obtidos para diferentes concentrações destes efetores, de forma a visualizar quais proteínas poderiam representar pares de interação direta.

Estudos na literatura desenvolveram um ensaio *in vitro* de uridilação de proteínas PII. É de nosso interesse modificar *in vitro* as proteínas PII recombinantes de *A. amazonense*, para posteriormente realizar experimentos de *pull-down* utilizando como isca as formas uridiladas dessas proteínas. Tentativas foram feitas empregando a enzima recombinante UTase/UR (GlnD) de *A. brasilense*, cujas condições para o ensaio *in vitro* já estão bem estabelecidas na literatura (ARAÚJO *et al.*, 2008). No entanto, a metodologia de verificação da uridilação por géis nativos não se demonstrou aplicável para as proteínas PII recombinantes de *A. amazonense*, e por isso estamos padronizando uma metodologia alternativa, na qual a massa total da proteína é medida em espectrômetro de massas MALDI-TOF no modo linear (dados não mostrados).

Diversos métodos podem ser empregados para a confirmação das interações mapeadas. Idealmente, dever-se-ia utilizar abordagens *in vivo*. Esforços estão sendo feitos em nosso laboratório de forma a padronizar metodologias de transformação e construir plasmídeos de clonagem/expressão que possam ser utilizados em *A. amazonense*. Também pretende-se obter soros policlonais para as proteínas purificadas no presente estudo. A escolha da metodologia adequada para o embasamento dos alvos de PII depende dos resultados desses esforços.

Além disso, as interações de maior interesse podem ser analisadas individualmente. Tentativa inicial de emprego da técnica de duplo híbrido em levedura, que já foi utilizada em diversos estudos de proteínas PII, falhou em demonstrar a interação de GlnB e GlnK de *A. amazonense* com NtrB, NifA e GroEL. Os diversos controles preconizados pela técnica apresentaram os resultados adequados (dados não mostrados). No entanto, não foi confirmado se as proteínas PII estavam sendo expressas na levedura, o que poderia levar a resultados falso-negativos. Essa técnica ainda deve ser otimizada para as proteínas PII de *A. amazonense* em nosso laboratório. Alternativamente, poder-se-ia realizar uma abordagem *in vitro* mais direta, como, por exemplo, um experimento de *pull-down* utilizando como isca uma das proteínas de interação identificadas, a fim de verificar se esta seria capaz de isolar as proteínas PII do extrato proteico de *A. amazonense*. Também é possível realizar experimentos de *pull-down* par a par, co-incubando as duas proteínas candidatas, apenas uma apresentando a *tag* de afinidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSHUN MN, LEVY SB The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol*, 1999; 7(10): 410-413.

ALTSCHUL SF *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997; 25(17): 3389-3402.

ARAÚJO LM *et al.* Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. *Braz J Med Biol Res*, 2008; 41(4): 289-294.

ARCONDEGUY T, JACK R, MERRICK M P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001; 65(1): 80-105.

ARNESANO F *et al.* The evolutionarily conserved trimeric structure of CutA1 proteins suggests a role in signal transduction. *J Biol Chem*, 2003; 278(46): 45999-46006.

ARSENE F, KAMINSKI PA, ELMERICH C Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J Bacteriol*, 1996; 178(16): 4830-4838.

ARSENE F, KAMINSKI PA, ELMERICH C Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. *FEMS Microbiol Lett*, 1999; 179(2): 339-343.

BAHLAWANE C, MCINTOSH M, KROL E, BECKER A *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008; 21(11): 1498-1509.

BALDANI J, CARUSO L, BALDANI VLD, GOI SR, DÖBEREINER J Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997; 29(5-6): 911-922.

BAUER E, KASPAR T, FISCHER HM, HENNECKE H Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. *J Bacteriol*, 1998; 180(15): 3853-3863.

BERG G Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009; 84(1): 11-18.

- BERTRAM-DROGATZ PA, QUESTER I, BECKER A, PÜHLER A The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. *Mol Gen Genet*, 1998; 257(4): 433-441.
- BLAUWKAMP TA, NINFA AJ Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. *Mol Microbiol*, 2002; 46(1): 203-214.
- BOCHNER BR, AMES BN Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J Biol Chem*, 1982; 257(16): 9759-9769.
- BUCK M, GALLEGOS MT, STUDHOLME DJ, GUO Y, GRALLA JD The bacterial enhancer-dependent sigma 54 (sigma N) transcription factor. *J Bacteriol*, 2000; 182(15): 4129-4136.
- BURDMAN S Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol Lett*, 2000; 189(2): 259-264.
- BURDMAN S, JURKEVITCH E, SCHWARTSBURD B, HAMPEL M, OKON Y Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology*, 1998; 144(7): 1989-1999.
- BURKOVSKI A Nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*: proteins, mechanisms, signals. *J Microbiol Biotechnol*, 2007; 17(2): 187-194.
- CHALLIS G A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, 2005; 6(4): 601-611.
- CHEAH E *et al.* Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. *Structure*, 1994; 2(10): 981-990.
- CHEN S, LIU L, ZHOU X, ELMERICH C, LI JL Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. *Mol Genet Genomics*, 2005; 273(5): 415-422.
- CHEN Y *et al.* The PII Signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate kinase. *J Biol Chem*, 2006; 281(9): 5726-5733.

CHENG J, JOHANSSON M, NORDLUND S Expression of P(II) and glutamine synthetase is regulated by P(II), the *ntrBC* products, and processing of the *glnBA* mRNA in *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol, 1999; 181(20): 6530-6534.

CONROY M *et al.* The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007; 104(4): 1213-1218.

COOLEY MB, D'SOUZA MR, KADO CI The *virC* and *virD* operons of the *Agrobacterium* Ti plasmid are regulated by the *ros* chromosomal gene: analysis of the cloned *ros* gene. J Bacteriol, 1991; 173(8): 2608-2616.

DE ZAMAROCZY M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. Mol Microbiol, 1998; 29(2): 449-463.

DE ZAMAROCZY M, PAQUELIN A, PELTRE G, FORCHHAMMER K, ELMERICH C Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol, 1996; 178(14): 4143-4149.

DEL GALLO M, NEGI M, NEYRA CA Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J Bacteriol, 1989; 171(6): 3504-3510.

DIXON R, KAHN D Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nat Rev Microbiol, 2004; 2(8): 621-631.

DÖBEREINER J, MARRIEL IE, NERY M Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can J Microbiol, 1976; 22(10): 1464-1473.

DÖBEREINER J, BALDANI JI, BALDANI VL Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa – SPI, 1995.

DODSWORTH J, LEIGH J Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate-reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006; 103(26): 9779-9784.

DOUCLEFF M, PELTON JG, LEE PS, NIXON BT, WEMMER DE Structural basis of DNA recognition by the alternative sigma-factor, sigma54. J Mol Biol, 2007; 369(4): 1070-1078.

DREPPER T *et al.* Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiol Lett, 2006; 258(2): 250-256.

ELLIS RJ, HEMMINGSEN SM Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. Trends Biochem Sci, 1989; 14(8): 339-342.

ELSEN S, DISCHERT W, COLBEAU A, BAUER C Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. J Bacteriol, 2000; 182(10): 2831-2837.

ELSEN S, SWEM L, SWEM D, BAUER C RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. Microbiol Mol Biol Rev, 2004; 68(2): 263-279.

EMMERICH R, HENNECKE H, FISCHER HM Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in alpha-Proteobacteria. Arch Microbiol, 2000; 174(5): 307-313.

ERCOLANO E, MIRABELLA R, MERRICK M, CHIURAZZI M The *Rhizobium leguminosarum glnB* gene is down-regulated during symbiosis. Mol Gen Genet, 2001; 264(5): 555-564.

FINN R *et al.* The Pfam protein families database. Nucl Acids Res, 2010; 38(suppl_1): D211-D222.

FISCHER HM *et al.* One member of a gro-ESL-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. The EMBO journal, 1993; 12(7): 2901-2912.

FISCHER HM, FRITSCH S, HERZOG B, HENNECKE H Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. FEBS Lett, 1989; 255(1): 167-171.

FISCHER HM, SCHNEIDER K, BABST M, HENNECKE H GroEL chaperonins are required for the formation of a functional nitrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*. Arch Microbiol, 1999; 171(4): 279-289.

FISCHER HM, HENNECKE H Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* nifA-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. Mol Gen Genet, 1987; 209(3): 621-626.

FONG ST, CAMAKARIS J, LEE BT Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 1995; 15(6): 1127-1137.

FORCHHAMMER K Glutamine signalling in bacteria. *Front Biosci*, 2007; 12358-370.

FORCHHAMMER K P(II) signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol*, 2008; 16(2): 65-72.

FOSTER-HARTNETT D, KRANZ RG Analysis of the promoters and upstream sequences of *nifA1* and *nifA2* in *Rhodobacter capsulatus*; activation requires *ntrC* but not *rpoN*. *Mol Microbiol*, 1992; 6(8): 1049-1060.

FRED EB, WAKSMAN SA Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to Microorganisms of the Soil: McGraw-Hill Book Company, Inc, 1928.

FRENCH C, BELL J, WARD B Diversity and distribution of hemerythrin-like proteins in prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett*, 2008; 279(2): 131-145.

FU HA *et al.* Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *J Bacteriol*, 1989; 171(9): 4679-4685.

GADAGI RS, SA TONGMIN, KULKARNI JH, KRISHNARAJ PU The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Scientia Horticulturae*, 2004; 100(1/4): 323-332.

GALLOWAY JN *et al.* The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 2003; 53(4): 341-356.

GLAZEBROOK J, WALKER GC A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell*, 1989; 56(4): 661-672.

GONZALEZ JE, YORK GM, WALKER GC *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene*, 1996; 179(1): 141-146.

GORG A, WEISS W, DUNN MJ Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004; 4(12): 3665-3685.

GOVEZENSKY D, BOCHKAREVA ES, ZAMIR A, GIRSHOVICH AS Chaperonins as potential gene regulatory factors. *In vitro* interaction and solubilization of NifA, the *nif* transcriptional activator, with GroEL. *J Biol Chem*, 1994; 269(19): 14003-14006.

GOVEZENSKY D, GREENER T, SEGAL G, ZAMIR A Involvement of GroEL in *nif* gene regulation and nitrogenase assembly. *J Bacteriol*, 1991; 173(20): 6339-6346.

GRAF J, RUBY EG Novel effects of a transposon insertion in the *Vibrio fischeri glnD* gene: defects in iron uptake and symbiotic persistence in addition to nitrogen utilization. *Mol Microbiol*, 2000; 37(1): 168-179.

GRAHAM PH, VANCE CP Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 2000; 65(2-3): 93-106.

GREGOR J, ZELLER T, BALZER A, HABERZETTL K, KLUG G Bacterial regulatory networks include direct contact of response regulator proteins: interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2007; 13(1-3): 126-139.

GRUSWITZ F, O'CONNELL J, STROUD R Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104(1): 42-47.

HARTL FU Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996; 381(6583): 571-579.

HARTMANN A, BALDANI JI The Genus *Azospirillum*. *The Prokaryotes*: Springer New York, 2006. p. 115-140.

HARTMANN A, FU H, BURRIS RH Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *J Bacteriol*, 1986; 165(3): 864-870.

HARTMANN A, ZIMMER W Physiology of *Azospirillum* In: Okon, Y., editors. *Azospirillum/Plant Associations*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 15-39.

HILL S Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. *Biological nitrogen fixation*: Chapman and Hall, 1992. p. 87-134.

HOURY WA, FRISHMAN D, ECKERSKORN C, LOTTSPEICH F, HARTL FU Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, 1999; 402(6758): 147-154.

HUERGO LF *et al.* Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. FEMS Microbiol Lett, 2003; 223(1): 33-40.

HUERGO LF *et al.* ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. Mol Microbiol, 2006a; 59(1): 326-337.

HUERGO LF *et al.* Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. FEBS Lett, 2006b; 580(22): 5232-5236.

HUERGO LF *et al.* Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. Mol Microbiol, 2007; 66(6): 1523-1535.

HUERGO L *et al.* *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, 2009; 284(11): 6674-6682.

HULO N *et al.* The 20 years of PROSITE. Nucleic acids research, 2008; 36(Database issue): D245-D249.

ISHIDA ML *et al.* Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. Braz J Med Biol Res, 2002; 35(6): 651-661.

JAGGI R, VAN HEESWIJK WC, WESTERHOFF HV, OLLIS DL, VASUDEVAN SG The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. EMBO J, 1997; 16(18): 5562-5571.

JAVELLE A, MERRICK M Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. Biochem Soc Trans, 2005; 33(Pt 1): 170-172.

JAVELLE A, SEVERI E, THORNTON J, MERRICK M Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. J Biol Chem, 2004; 279(10): 8530-8538.

JIANG P *et al.* Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. J Bacteriol, 1997; 179(13): 4342-4353.

JIANG P, PELISKA JA, NINFA AJ 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*, 1998a; 37(37): 12782-12794.

JIANG P, PELISKA J, NINFA A Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of *ntr* gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1998b; 37(37): 12795-12801.

JIANG P, PELISKA JA, NINFA AJ The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. *Biochemistry*, 1998c; 37(37): 12802-12810.

JIANG P, NINFA AJ Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J Bacteriol*, 1999; 181(6): 1906-1911.

JIANG P, NINFA A *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge *in vitro*. *Biochemistry*, 2007; 46(45): 12979-12996.

JIANG P, NINFA A Alpha-ketoglutarate controls the ability of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein to regulate the activities of NRII (NtrB) but does not control the binding of PII to NRII. *Biochemistry*, 2009a; 48(48): 11514-11521.

JIANG P, NINFA A Sensation and signaling of alpha-ketoglutarate and adenylate energy charge by the *Escherichia coli* PII signal transduction protein require cooperation of the three ligand-binding sites within the PII trimer. *Biochemistry*, 2009b; 48(48): 11522-11531.

JOSHI H, TABITA R A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93(25): 14515-14520.

KAMBEROV ES, ATKINSON MR, NINFA AJ The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J Biol Chem*, 1995; 270(30): 17797-17807.

KEENER J, KUSTU S Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85(14): 4976-4980.

KELLER M *et al.* Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995; 8(2): 267-277.

KERNER M *et al.* Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell*, 2005; 122(2): 209-220.

KIM J, REES DC Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 1994; 33(2): 389-397.

KOCHER T, SUPERTI-FURGA G Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. *Nat Methods*, 2007; 4(10): 807-815.

KOEBNIK R TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol*, 2005; 13(8): 343-347.

KUNTE HJ, CRANE RA, CULHAM DE, RICHMOND D, WOOD JM Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1999; 181(5): 1537-1543.

LAUB M, GOULIAN M Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet*, 2007; 41:121-145.

LEE JW, HELMANN J Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals*, 2007; 20(3-4): 485-499.

LEE SH, FROST LS, PARANCHYCH W FinOP repression of the F plasmid involves extension of the half-life of FinP antisense RNA by FinO. *Mol Gen Genet*, 1992; 235(1): 131-139.

LEIGH JA, WALKER GC Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in genetics*, 1994; 10(2): 63-67.

LEIGH J, DODSWORTH J Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu Rev Microbiol*, 2007; 61:349-377.

LENGELER J, DREWS G, SCHLEGEL H. *Biology of the Prokaryotes*: Wiley-Blackwell, 1999.

LIANG YY, DE ZAMAROCZY M, ARSENE F, PAQUELIN A, ELMERICH C Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. FEMS Microbiol Lett, 1992; 79(1-3): 113-119.

LIANG YY, KAMINSKI PA, ELMERICH C Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Mol Microbiol, 1991; 5(11): 2735-2744.

LIN W, OKON Y, HARDY RW Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl Environ Microbiol, 1983; 45(6): 1775-1779.

LINEHAN S, RYTKONEN A, YU XJ, LIU M, HOLDEN D SlyA regulates function of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. Infect Immun, 2005; 73(7): 4354-4362.

LUND P Multiple chaperonins in bacteria--why so many? FEMS Microbiol Rev, 2009; 33(4): 785-800.

MADIGAM MT, MARTINKO JM, PARKER J. Microbiologia de Brock. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAGALHÃES FM, BALDANI JL, SOUTO, SM, KUYKENDALL, JR, DÖBEREINER J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An Acad Bras Cienc, 1983; 55, 417-429.

MARCHLER-BAUER A *et al.* CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Nucleic acids research, 2009; 37(Database issue): D205-D210.

MARCHLER-BAUER A, BRYANT S CD-Search: protein domain annotations on the fly. Nucleic Acids Res, 2004; 32(Web Server issue).

MARTIN GB, THOMASHOW MF, CHELM BK *Bradyrhizobium japonicum* *glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. J Bacteriol, 1989; 171(10): 5638-5645.

MARTIN-DIDONET CC *et al.* Genome structure of the genus *Azospirillum*. J Bacteriol, 2000; 182(14): 4113-4116.

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, 2004; 186(3): 601-610.

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*, 2004; 186(3): 601-610.

MARTINEZ-ARGUDO I, LITTLE R, SHEARER N, JOHNSON P, DIXON R Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochem Soc Trans*, 2005; 33(Pt 1): 152-156.

MASTROLEO F *et al.* Shotgun proteome analysis of *Rhodospirillum rubrum* S1H: Integrating data from gel-free and gel-based peptides fractionation methods. *J Proteome Res*, 2009; 8(5): 2530-2541.

MICHEL-REYDELLET N, DESNOUES N, ELMERICH C, KAMINSKI PA Characterization of *Azorhizobium caulinodans* *glnB* and *glnA* genes: involvement of the P(II) protein in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol*, 1997; 179(11): 3580-3587.

MIROUX B, WALKER JE Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 1996; 260(3): 289-298.

MONTI M, COZZOLINO M, COZZOLINO F, TEDESCO R, PUCCI P Functional proteomics: protein-protein interactions *in vivo*. *Ital J Biochem*, 2007; 56(4): 310-314.

MONTI M *et al.* Puzzle of protein complexes *in vivo*: a present and future challenge for functional proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2009; 6(2): 159-169.

MORETT E, SEGOVIA L The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol*, 1993; 175(19): 6067-6074.

MORTON C SH3 Domains: Molecular 'Velcro'. *Current Biology*, 1994; 4(7): 615-617.

MOSLEY CS, SUZUKI JY, BAUER CE Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J Bacteriol*, 1994; 176(24): 7566-7573.

NELSON DL, COX MM Lehninger Principles of Biochemistry: WH Freeman, 2005.

NEUMANN L *et al.* Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *J Bacteriol*, 2008; 190(8): 2911-2919.

NINF A AJ, ATKINSON MR PII signal transduction proteins. Trends Microbiol, 2000; 8(4): 172-179.

NINF A AJ, JIANG P PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. Curr Opin Microbiol, 2005; 8(2): 168-173.

NUR I, STEINITZ Y, OKON Y, HENIS Y Carotenoid composition and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. J Gen Microbiol, 1981; 122(1): 27-32.

OLIVEIRA A, URQUIAGA S, DÖBEREINER J, BALDANI J Biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagated sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria, 2002. p. 425-425.

OSANAI T, TANAKA K Keeping in touch with PII: PII-interacting proteins in unicellular cyanobacteria. Plant Cell Physiol, 2007; 48(7): 908-914.

PATRIQUIN DG, DÖBEREINER J, JAIN DK Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can J Microbiol, 1983; 29:900-915.

PATZER SI, HANTKE K The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000; 275(32): 24321-24332.

PAWLOWSKI A *et al.* Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol, 2003; 185(17): 5240-5247.

PAWLOWSKI K, KLOSSE U, DE BRUIJN FJ Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. Mol Gen Genet. , 1991; 231(1): 124-138.

PIOSZAK AA, NINF A AJ Genetic and biochemical analysis of phosphatase activity of *Escherichia coli* NRII (NtrB) and its regulation by the PII signal transduction protein. J Bacteriol, 2003; 185(4): 1299-1315.

PIOSZAK A, NINF A A Mutations altering the N-terminal receiver domain of NRI (NtrC) That prevent dephosphorylation by the NRII-PII complex in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004; 186(17): 5730-5740.

POPE MR, MURRELL SA, LUDDEN PW Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphoribosylation of a specific arginine residue. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985; 82(10): 3173-3177.

POTRICH DP, PASSAGLIA LM, SCHRANK IS Partial characterization of nif genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. Braz J Med Biol Res, 2001; 34(9): 1105-1113.

RAE JL, CUTFIELD JF, LAMONT IL Sequences and expression of pyruvate dehydrogenase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1997; 179(11): 3561-3571.

READING N, RASKO D, TORRES A, SPERANDIO V A transcriptome study of the QseEF two-component system and the QseG membrane protein in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7, Microbiology, 2010.

REITZER L Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol, 2003; 57:155-176.

REUTHER J, WOHLLEBEN W Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. J Mol Microbiol Biotechnol, 2007; 12(1-2): 139-146.

RIPPA V *et al.* The ribosomal protein L2 interacts with the RNA polymerase {alpha} subunit and acts as a transcription modulator in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2010.

RODRIGUES E *et al.* *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). Plant and Soil, 2008; 302(1): 249-261.

SADASIVAN L, NEYRA CA Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. J Bacteriol, 1985; 163(2): 716-723.

SAIKIA SP, JAIN V Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? Current Science, 2007; 92(3): 317-322.

SAKAI H *et al.* Crystal structures of the signal transducing protein GlnK from *Thermus thermophilus* HB8. J Struct Biol, 2005; 149(1): 99-110.

SAMBROOK J, RUSSELL DW Molecular Cloning a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANT'ANNA FH Análise do gene *glnK* da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense*. Dissertação de bacharelado para o curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005

SANT'ANNA F *et al.* The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. *J Mol Evol*, 2009; 68(4): 322-336.

SCHAUER K, RODIONOV D, DE REUSE H New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem Sci*, 2008; 33(7): 330-338.

SCHMITZ RA, KLOPPROGGE K, GRABBE R Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the *nif* transcriptional activator NifA. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2002; 4(3): 235-242.

SELAO T, NORDLUND S, NORÉN A comparative proteomic studies in *Rhodospirillum rubrum* grown under different nitrogen conditions. *J Proteome Res*, 2008; 7(8): 3267-3275.

SENIOR PJ Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J Bacteriol*, 1975; 123(2): 407-418.

SGANGA M Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*, 1992; 68(5): 945-954.

STADTMAN ER, SHAPIRO BM, KINGDON HS, WOOLFOLK CA, HUBBARD JS Cellular regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*. *Adv Enzyme Regul*, 1968; 6: 257-89.

STEENHOUDT O, VANDERLEYDEN J *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, 2000; 24(4): 487-506.

SULAVIK MC, GAMBINO LF, MILLER PF The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol Med*, 1995; 1(4): 436-446.

THOMAS G The *glnKamtB* operon a conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet*, 2000; 16(1): 11-14.

TOBIAS JW, SHRADER TE, ROCAP G, VARSHAVSKY A The N-end rule in bacteria. *Science*, 1991; 254(5036): 1374-1377.

TORRES M, CONDON C, BALADA JM, SQUIRES C, SQUIRES C Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J*, 2001; 20(14): 3811-3820.

TRENTINI, DB Isolamento e análise do gene *glnB* de *Azospirillum amazonense*. Dissertação de bacharelado para o curso de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007

TWERDOCHLIB AL *et al.* Expression, purification, and DNA-binding activity of the solubilized NtrC protein of *Herbaspirillum seropedicae*. *Protein Expr Purif*, 2003; 30(1): 117-123.

ULT-RICHÉ D, FRALEY CD, TZENG CM, KORNBERG A Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998; 180(7): 1841-1847.

UMALI-GARCIA M, HUBBELL DH, GASKINS MH, DAZZO FB Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl Environ Microbiol*, 1980; 39(1): 219-226.

VAN DOMMELEN A, KEIJERS V, SOMERS E, VANDERLEYDEN J Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. *Mol Genet Genomics*, 2002; 266(5): 813-820.

VAN HEESWIJK WC *et al.* An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1996; 21(1): 133-146.

VAN HEESWIJK WC, RABENBERG M, WESTERHOFF HV, KAHN D The genes of the glutamine synthetase adenylylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1993; 9(3): 443-457.

VAN HEESWIJK WC *et al.* An additional PII in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. *FEMS Microbiol Lett*, 1995; 132(1-2): 153-157.

WATANABE K *et al.* Roles of conserved amino acid sequence motifs in the SpoU (TrmH) RNA methyltransferase family. *J Biol Chem*, 2005; 280(11): 10368-10377.

WEDEL A, KUSTU S The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes Dev*, 1995; 9(16): 2042-2052.

WEISS V, MAGASANIK B Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85(23): 8919-8923.

WILKINSON S, GROVE A Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol*, 2006; 8(1): 51-62.

WOODGATE R, RAJAGOPALAN M, LU C, ECHOLS H UmuC mutagenesis protein of *Escherichia coli*: purification and interaction with UmuD and UmuD'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; 86(19): 7301-7305.

XU Y, CARR PD, HUBER T, VASUDEVAN SG, OLLIS DL The structure of the PII-ATP complex. *Eur J Biochem*, 2001; 268(7): 2028-2037.

XU Y *et al.* GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J Mol Biol*, 1998; 282(1): 149-165.

YANCEY JE, MATSON SW The DNA unwinding reaction catalyzed by Rep protein is facilitated by an RHSP-DNA interaction. *Nucleic acids research*, 1991; 19(14): 3943-3951.

YASUKAWA T *et al.* Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem*, 1995; 270(43): 25328-25331.

YEATS C, BENTLEY S, BATEMAN A New knowledge from old: *in silico* discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC microbiology*, 2003; 3.

YILDIZ O, KALTHOFF C, RAUNSER S, KÜHLBRANDT W Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. *EMBO J*, 2007; 26(2): 589-599.

ZENGEL JM, LINDAHL L Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1994; 47331-370.

ZHANG Y, BURRIS RH, LUDDEN PW, ROBERTS GP Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997; 152(2): 195-204.

ZHANG Y, POHLMANN EL, ROBERTS GP GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol, 2005; 187(4): 1254-1265.

ZHU Y, CONRAD MC, ZHANG Y, ROBERTS GP Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. J Bacteriol, 2006; 188(5): 1866-1874.

ZHU Y, CONRAD M, ZHANG Y, ROBERTS G Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. J Bacteriol, 2006; 188(5): 1866-1874.

ZHULIN IB, BESPALOV VA, JOHNSON MS, TAYLOR BL Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol, 1996; 178(17): 5199-5204.

ZIMMER DP *et al.* Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000; 97(26): 14674-14679.

8. ANEXOS

8.1 Vetores de expressão pET-23(+)

Observações: Os mapas de pET-23b(+), pET-23c(+), e pET-23d(+) são os mesmos de pET-23a(+), com as seguintes exceções:

- pET-23b(+) é um plasmídeo de 3665 pb; subtrair 1 pb para a localização de cada sítio de restrição a montante de BamHI na posição 198.

- pET-23c(+) é um plasmídeo de 3664 pb; subtrair 2 pb para a localização de cada sítio de restrição a montante de BamHI na posição 198.

- pET-23d(+) é um plasmídeo de 3663 pb; o sítio de BamHI está na mesma fase de leitura do que em pET-23c(+).

- Um sítio de NcoI está substituído por NdeI com uma perda de 1 pb na posição 238 pET-23c(+). Portanto, NcoI cliva pET-23d(+) em 234, e NheI cliva em 229.

- Para o restante dos sítios, subtrair 3 pb de cada sítio a montante da posição 239 de pET-23a(+).

- NdeI não cliva pET-23d(+). StyI não é sítio único em pET-23d(+).

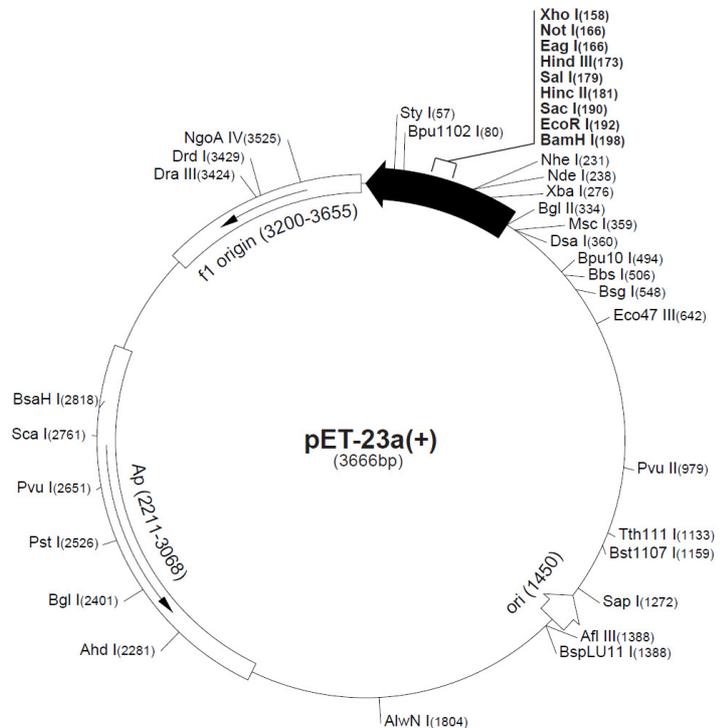


FIGURA 8.1 Mapa do vetor de expressão pET-23a(+). O mapa apresentado é característico da série de vetores pET-23. O mapa de pET-23d, utilizado para a expressão do gene *glnB* de *A. amazonense*, se difere apenas pela presença de um sítio para NcoI e por alguns pares de bases na posição dos sítios de restrição na região de policlonagem (ver Figura 8.2).

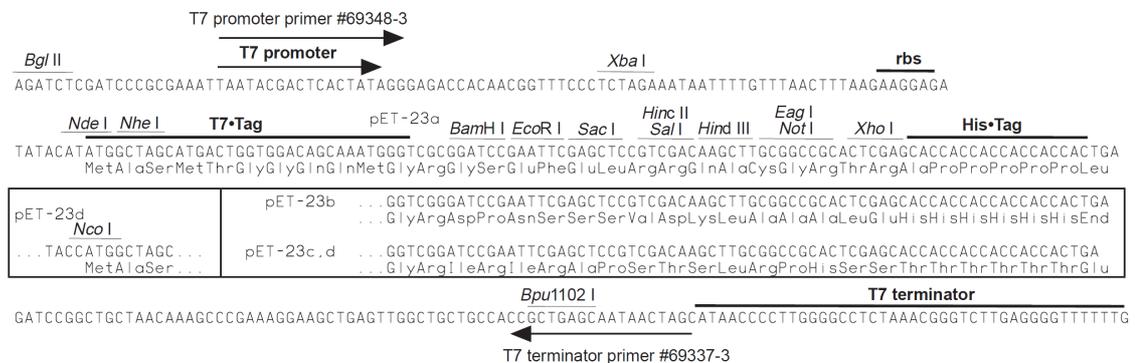


FIGURA 8.2 Região de clonagem/expressão de vetores da série pET-23. Para a expressão do gene *glnB* de *A. amazonense* foram utilizados os sítios NcoI (5') e XhoI (3') excluindo o códon de terminação do gene, de forma a conferir cauda de histidina carboxi-terminal.

8.2 Vetor de expressão pET-28a(+)

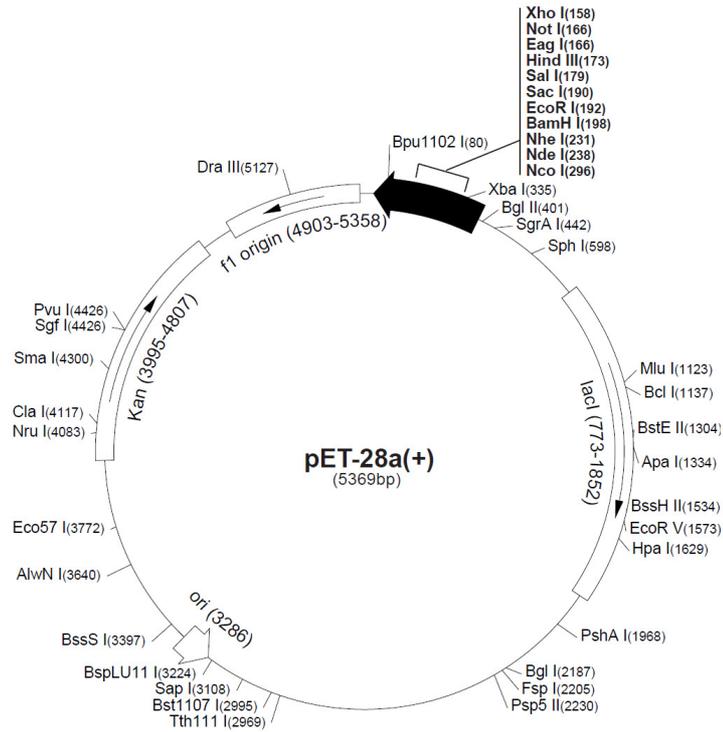


FIGURA 8.3 Mapa do vetor de expressão pET-28a(+). Vetor utilizado para a expressão do gene *glnK* de *A. amazonense*.

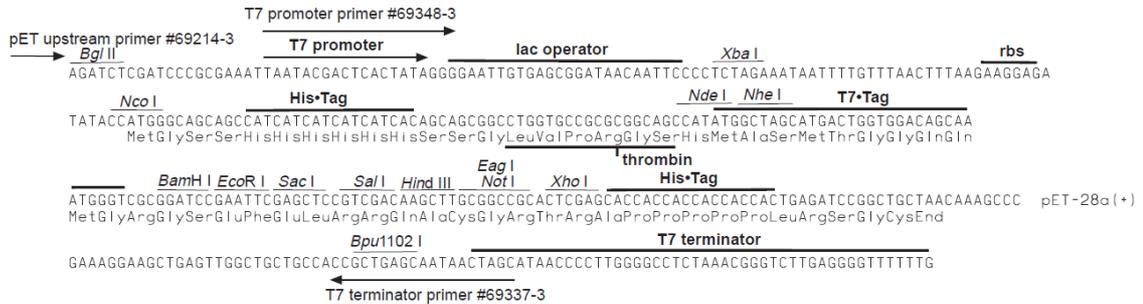


FIGURA 8.4 Região de clonagem/expressão de vetor pET-28a. Para a expressão do gene *glnK* de *A. amazonense* foram utilizados os sítios NdeI (5') e BamHI (3') mantendo o códon de terminação do gene, de forma a conferir cauda de histidina amino-terminal.

8.3 Protocolo: Digestão trípica *in gel* de proteínas coradas com Coomassie

Materiais

- Papel alumínio;
- Tubos eppendorf de 0,5 mL lavados 2X com metanol e 1X com água MilliQ;
- Placa de vidro;
- Lâmina de bisturi limpa;
- Banho maria ou bloco de aquecimento a 37°C e 56°C;
- Concentrador a vácuo (MiVac);
- Centrífuga para tubos eppendorf;
- Vortex;
- Ponteiras livres de queratina (novas, em caixa lavada com metanol);

Soluções

- 25 mM NH_4HCO_3 ;
- 25 mM NH_4HCO_3 em 50% acetonitrila;
- Acetonitrila 100%
- 10 mM DTT em 25 mM NH_4HCO_3 (preparar na hora);
- 55 mM iodoacetamida em 25 mM NH_4HCO_3 (preparar na hora, solução sensível à luz, manter embalada em papel alumínio);
- Tripsina (para espectrometria de massas, preferencialmente modificada – exe: Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) 10 ng/ μL em 25 mM NH_4HCO_3 (armazenar a -70°C, não reutilizar após descongelar);
- Ácido fórmico 5% em 50% acetonitrila;
- Ácido fórmico 1% em H_2O MilliQ.

Considerações gerais

Para minimizar a chance de contaminação por queratina, usar luvas sempre (trocar frequentemente), usar avental e manter cabelos presos. Trabalhar em um ambiente limpo, livre de poeira. Limpar lâmina de bisturi e placa de vidro com metanol antes do uso.

Procedimentos

I. Remoção do corante Coomassie

- a) Descorar o gel preferencialmente em H₂O MilliQ. Caso tenha usado ácido acético, lavar o gel diversas vezes por longo período em H₂O MilliQ, até completa remoção do ácido.
- b) Usando a lâmina de bisturi, cortar o mais próximo possível das bandas de interesse. Utilizando a placa de vidro como apoio, cortar as bandas em cubos de 1mm³ e transferí-los para tubo eppendorf de 0,5 mL.

Obs: o tamanho dos pedaços é crítico: se menores que 1mm³ poderão entrar no tipp e serem recolhidos durante as extrações, podendo posteriormente entupir a coluna UPLC. Também pode haver perda de proteína durante as lavagens. Se maiores serão mais difíceis de descorar, resultando em contaminação por coomassie e consequente supressão da ionização.

- c) Adicionar 300 µL de 25 mM NH₄HCO₃ em 50% acetonitrila. Manter descorando nessa solução por 30 min ou mais (preferencialmente sob agitação, no vortex). Remover o líquido com a micropipeta e descartá-lo (o líquido deverá estar azul).
- d) Repetir o passo acima mais 2X, totalizando 3 lavagens. Observar se os pedaços de gel estão completamente sem cor (inclusive no centro dos pedaços). Caso ainda haja resquícios de cor, rehidratá-los com 100 µL de 25 mM NH₄HCO₃ por 10 min, descartar o excesso de líquido e repetir a lavagem com 300 µL de 25 mM NH₄HCO₃ em 50% acetonitrila. Repetir a rehidratação e lavagem até que os géis estejam sem cor.
- e) Adicionar acetonitrila 100% até cobrir os géis. Aguardar 10 minutos. Os géis irão desidratar, tornando-se menores e opacos. Secar em aparelho a vácuo (MiVac) a 40°C. Os géis ficarão cristalinos quando secos.

Obs: este é um bom ponto de parada. Os géis desidratados podem ser armazenados a 4°C por um dia ou a -20°C por períodos maiores.

II. Redução e carboxiamidometilação dos resíduos de cisteína

Obs: A redução e alquilação dos resíduos de cisteína causa ruptura permanente de pontes dissulfeto. Esse tratamento abre a estrutura proteica para a digestão e minimiza complicações na separação de peptídeos, ao eliminar pares de peptídeos que permanecem conectados via pontes S-S. Portanto, esse tratamento deve ser incluído quando a recuperação máxima de peptídeos separados por gel 2D é necessária, ou quando bandas provindas de gel unidimensional são digeridas.

- a) Redução: Rehidratar os géis com solução de 10 mM DTT em 25 mM NH₄HCO₃ recém preparada, até cobrir os géis com uma fina camada de líquido (25 a 35µL para bandas pequenas). Vortex, spin e incubar a 56°C por 1h.
- b) Alquilação: Remover e descartar o líquido. Adicionar 55 mM iodoacetamida em 25 mM NH₄HCO₃, até que os géis estejam cobertos por uma fina camada de solução. Vortex, spin e incubar por 45 min a temperatura ambiente no escuro.
- c) Remover o sobrenadante e descartar. Lavar os géis com 100 µL de 25 mM NH₄HCO₃: vortexar nessa solução por 10 min e descartar o líquido.
- d) Lavar os géis com 100 µL de 25 mM NH₄HCO₃ em acetonitrila 50%. Vortexar nessa solução por 5 minutos e descartar o sobrenadante.

- e) Desidratar os géis com acetonitrila 100%. Adicionar quantidade suficiente para cobrir os géis e aguardar 10 minutos. Géis desidratados são menores e opacos. Secar em aparelho a vácuo (MiVac) a 45°C, até ficarem cristalinos e sem vestígio de líquido.

Obs: Os géis desidratados podem ser armazenados a 4°C por um dia ou a -20°C por períodos maiores.

III. Digestão Triptica

- a) Rehidratar os géis com solução de tripsina 10 ng/μL. Utilizar quantidades pequenas (10μL serve para a maioria das bandas). Caso a quantidade de proteína presente seja conhecida, usar uma relação de 1:20 a 1:100 de tripsina/proteína.

Obs: quantidade excessiva irá resultar na formação de peptídeos provenientes de autólise da tripsina, que podem dificultar as análises por espectrometria de massas. Autólise da tripsina nativa gera pseudotripsina, que possui especificidade modificada. É conveniente utilizar tripsina com resíduos de lisina modificados, que a tornam resistente a autólise. Para minimizar o problema, também recomenda-se descongelar alíquotas de tripsina no gelo e rehidratar os géis em temperaturas baixas, de forma que a enzima possua atividade apenas quando em presença do seu substrato.

- b) Cobrir os pedaços de gel com 25 mM NH₄HCO₃, para garantir sua total hidratação.

- c) Incubar a 37°C por 16 a 24 horas.

Obs: Digestão por períodos muito prolongados favorece autólise da tripsina.

IV. Extração de peptídeos

- a) Se presente, transferir sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 0,5 mL.

- b) Aos pedaços de gel, adicionar 50 μL de ácido fórmico 5% em 50% acetonitrila. Incubar nessa solução por 1h ou mais, preferencialmente no vortex. Transferir o sobrenadante para novo tubo eppendorf (o mesmo do passo anterior).

Obs: o ácido fórmico é preferencialmente utilizado para amostras que serão submetidas a ionização por electrospray. Em outros casos (como ionização por MALDI), deverá se utilizar ácido trifluoroacético (TFA).

- c) Repetir a extração com 50 μL de ácido fórmico 5% em 50% acetonitrila (passo 4b). Transferir o sobrenadante para o mesmo tubo da extração anterior.

- d) Secar os sobrenadantes recolhidos em concentrador a vácuo (MiVac) a 45°C. Resuspender em 10 μL de ácido fórmico 1% (em H₂O). As amostras estão prontas para LC-MS/MS.

Obs: Comumente não se observa a presença de precipitados após a secagem. Pequenos cristais podem indicar a presença de pedaços de gel que foram acidentalmente recolhidos nas extrações. Deve-se tomar cuidado para não transferi-los para o vial do espectrometro de masa. Pó azul ou amarelo pode ser indicativo de resquícios de corante Coomassie. O ácido fórmico auxilia na ionização por electrospray, sendo que o TFA pode inibir. No entanto, para ionização por MALDI deve-se resuspender a amostra em TFA 0,1%.

8.4 CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome Débora Broch Trentini
Filiação Gerson Adir Trentini e Dóris Maria Broch Trentini
Nascimento 17/09/1986 - Porto Alegre/RS - Brasil

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves 9500, Bloco IV, Prédio 43421,
Laboratório 222
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil
Telefone: 51 33086077

Endereço eletrônico deborabtrentini@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2008 Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal
PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense*
Orientador: Irene Silveira Schrank
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2007 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brasil
Título: Isolamento e análise do gene *glnB* de *Azospirillum amazonense*
Orientador: Irene Silveira Schrank
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Centro de Biotecnologia, Laboratório de Microrganismos Diazotróficos

03/2008 – 03/2010 Enquadramento funcional: estudante de mestrado, carga horária: 40, regime: integral

2. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS

11/2007 – 02/2008 Enquadramento funcional: estagiária, carga horária: 40, regime: integral

3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Centro de Biotecnologia, Laboratório de Microrganismos Diazotróficos

09/2004 – 10/2008

Enquadramento funcional: estudante de iniciação científica, carga horária: 20, regime: parcial

IDIOMAS

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

PRÊMIOS E TÍTULOS

2008 Láurea Acadêmica - Curso de Biomedicina - 1ª turma, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. SANT'ANNA, F. H.*; TRENTINI, D. B.*; WEBER, S. S.; CECAGNO, R.; SILVA, S. C.; SCHRANK, I. S. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. *Journal of Molecular Evolution*. 2009; 68, 322-336. ISSN/ISBN: 00222844.

*contribuição equivalente

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, I. S.
Análise regulatória das proteínas PII no metabolismo de nitrogênio da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
2. ANDRADE, D. S., SANT'ANNA, F. H., TRENTINI, D. B., SCHRANK, I. S.
Caracterização de genes que codificam para diguanilato ciclase/fosfodiesterase e para a proteína DnaK de *Azospirillum amazonense* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
3. MACHADO, M. R. S., SANT'ANNA, F. H., TRENTINI, D. B., SCHRANK, I. S.
Caracterização dos genes *rpoh* e *rela* em *Azospirillum amazonense* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
4. TRENTINI, D. B., SCHRANK, I. S.
Mapping of the interactome of PII family proteins from the free living diazotroph *Azospirillum amazonense* In: 3º Congresso BrMass, 2009, Campinas.
5. SANT'ANNA, F. H., TRENTINI, D. B., WEBER, S. S., CECAGNO, R., SCHRANK, I. S. Aspectos evolutivos da superfamília de proteínas sinalizadoras PII In:

26º Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

6. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, I. S.

Caracterização e expressão das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense* In: 26a Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

7. FONTANARI, A. M. V., TRENTINI, D. B., SCHRANK, I. S.

Isolamento do gene que codifica para o fator transcricional NtrC do diazotrófico *Azospirillum amazonense* In: XX Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre.

8. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, I. S.

O gene *glnB* do diazotrófico *Azospirillum amazense* sofre regulação transcricional em resposta aos níveis de nitrogênio In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre.

9. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, I. S.

Sequence isolation and transcriptional regulation of the PII protein encoding gene *glnB* of the diazotroph *Azospirillum amazonense* In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba - Argentina.

10. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, I. S.

Transcriptional regulation of the *Azospirillum brasilense orf2-nifUSV-orf4* operon, involved with nitrogenase biosynthesis In: I International Workshop in *Azospirillum*: CELL PHYSIOLOGY, PLANT RESPONSE AND AGRONOMIC RESEARCH, 2007, Córdoba - Argentina.

11. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, I. S.

Análise da região regulatória do operon *nifUSV* de *Azospirillum brasilense* In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre.

12. MAURMANN, K., TRENTINI, D. B., CECAGNO, R., SCHRANK, I. S.

Caracterização de mutantes de *Chromobacterium violaceum* obtidos utilizando mutagênese aleatória por transposons In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre.

13. TRENTINI, D. B., CECAGNO, R., BROETTO, L., SCHRANK, I. S.

Isolamento de mutantes de *Chromobacterium violaceum* utilizando mutagênese aleatória por transposons In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro.

14. CECAGNO, R., TRENTINI, D. B., SCHRANK, I. S.

Análise de seqüências diferenciais entre os diazotróficos *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense* In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia.

15. TRENTINI, D. B., CECAGNO, R., SCHRANK, I. S.

Caracterização de genes relacionados ao sistema de transporte em membrana (ABC) de *Azospirillum amazonense* In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre.