



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

Estudo dos antiporters Na^+/H^+ NhaC e NhaE de
Neisseria meningitidis

Marco André Moras Videira

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR
EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL

OUTUBRO, 2013



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

Estudo dos antiporters Na^+/H^+ NhaC e NhaE de
Neisseria meningitidis

Mestrando: Marco André Moras Videira

Orientadora: Doutora Ana Margarida Nunes Portugal Carvalho Melo, investigadora auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

OUTUBRO, 2013

O conteúdo desta dissertação foi produzido no Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT)

PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES

A partir de parte dos resultados obtidos no decorrer do presente trabalho, foram publicados os seguintes estudos, o primeiro em revista internacional com arbitragem científica, e o segundo no livro de resumos de evento europeu.

SOUSA, P.M.F., **VIDEIRA, M.A.M.**, VORBURGER, T., SILVA, S.T.N., MOIR, J.W, STEUBER, J. & MELO, A.M.P. 2013. The novel NhaE-type Na⁺/H⁺ antiporter of the pathogenic bacterium *Neisseria meningitidis*. *Archives of microbiology*, 195 (3), pp. 211-217.

VIDEIRA, M.A.M., SOUSA, P.M.F, VORBURGER, T., STEUBER, J., MELO, A.M.P. 2012. Identification and characterization of a new Na⁺/H⁺ antiporter in *Neisseria meningitidis*. Trabalho apresentado como poster no European Bioenergetics Conference 2012, *EBEC Abstract Book*, Freiburg.

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui a minha gratidão a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta dissertação:

A toda a estrutura e pessoas do Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT), onde foi concebido e realizado todo trabalho produzido nesta tese, por me terem ajudado e recebido.

Agradeço à minha orientadora, Doutora Ana Melo, pela supervisão, revisão e críticas que ajudaram à construção deste manuscrito, assim como pela sua paciência e disponibilidade. Pelo apoio e autoridade demonstrados e pelos ensinamentos ao longo deste anos, que fizeram de mim um melhor cientista e uma melhor pessoa. Um muito obrigado.

Ao Pedro Sousa e ao Filipe Santos do grupo de bioenergética e próteómica do IICT pela ajuda e companheirismo durante estes anos. Principalmente ao Pedro, pelos conselhos e apoio, sempre que foi preciso.

À Doutora Lígia Saraiva pela co-orientação deste trabalho no que se refere à construção dos mutantes pontuais por mutagénesis dirigida. Também aos colegas do *Molecular Genetics of Microbial Resistance* do ITQB pelo companheirismo e pela forma fácil e rápida que possibilitaram a minha integração.

À minha família pela compreensão. À Camila Fernandes pela ajuda, conselhos e críticas. Pela amizade e sinceridade. Obrigado por me fazeres feliz.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

Estudo dos antiporters Na^+/H^+ NhaC e NhaE de *Neisseria meningitidis*

Marco André Moras Videira

Os antiporters Na^+/H^+ são proteínas membranares, encontradas em todos os reinos e envolvidas na homeostasia do Na^+ e do pH. Dois antiporters Na^+/H^+ , denominados NmNhaC e NmNhaE foram identificados no genoma da bactéria patogénica, *Neisseria meningitidis*, e estudados através da sua expressão heteróloga numa estirpe de *E. coli* deficiente em antiporters Na^+/H^+ , a estirpe *E. coli* KNabc. Os antiporters Na^+/H^+ de *N. meningitidis*, foram capazes de conferir resistência ao Na^+ , a esta estirpe, sugerindo que os dois possam contribuir para a homeostasia do Na^+ e pH. O NmNhaE é também capaz de transportar Li^+ , e parece ser o principal antiporter Na^+/H^+ a contribuir para este papel em *N. meningitidis*. O NmNhaE tem atividade de antiporter Na^+/H^+ entre valores de pH 6.5 a 9, e a atividade $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ ótima é observada a pH 7. Além disso, verificou-se que o NmNhaE tem maior afinidade para o Na^+ . Com o objetivo de encontrar resíduos importantes na função e estrutura do NmNhaE, dez resíduos de aminoácidos foram selecionados a partir de comparações de alinhamentos entre sequências de aminoácidos, e também através de estudos anteriores de mutagénese dirigida noutros antiporters Na^+/H^+ , tendo as mutações pontuais sido intruzidas no gene *nhaE*, resultando nas mutações E91Q, H161L, G174S, D182N, H201L, V258T, H272L, H356L, H361L e G413S. Quando a expressão dos mutantes foi induzida em *E. coli* KNabc, todos os mutantes, com exceção dos mutantes G174S e H201L, foram capazes de complementar a estirpe KNabc, permitindo que esta crescesse em meio LBK líquido com NaCl 500 mM. Este facto sugere que as mutações G174S e H201L podem impedir a atividade de antiporter Na^+/H^+ . Nos mutantes E91Q, V258T e H361L o K_m determinado a pH 7, para o Na^+ , é semelhante ao determinado no NhaE selvagem, contudo o seu V_{max} sofreu uma descida de quase duas vezes. Além disso, a atividade medida a pH 7 para os mutantes V258T e E91Q, e a atividade medida a 7.5 para o mutante V258T, diminuiu relativamente ao NhaE selvagem. Este resultado juntamente com as atividades medidas a pH 7 e 7.5, sugerem que os resíduos E91, V258, H361 estejam envolvidos na resposta ao pH. No mutante H272L, verificou-se um aumento no K_m determinado para o Na^+ a pH 7 para quase o dobro, enquanto o V_{max} se manteve inalterado em relação ao NhaE selvagem. Os parâmetros cinéticos e as atividades medidas a pH 7 e 7.5 sugerem que o resíduo H272 pode estar envolvido no transporte de Na^+ e também na resposta ao pH. Nos restantes resíduos não se verificou atividade de antiporter Na^+/H^+ . Este trabalho contribuiu para uma melhor compreensão do transporte de Na^+ nos antiporters Nha de *N. meningitidis*, nomeadamente no funcionamento e estrutura do NhaE. No futuro, este trabalho pode fornecer informação relevante quanto ao papel do Na^+ na infeção e sobrevivência desta bactéria no hospedeiro.

Palavras-chaves: *Neisseria meningitidis*; Antiporters Na^+/H^+ ; NhaE; NhaC; Mutações pontuais.

ABSTRACT

Study of NhaC and NhaE Na⁺/H⁺ antiporters from *Neisseria meningitidis*

Marco André Moras Videira

Na⁺/H⁺ antiporters are membrane proteins present in all kingdoms involved in Na⁺ and pH homeostasis. Two Na⁺/H⁺ antiporters, NmNhaC and NmNhaE, from the pathogenic bacterium, *Neisseria meningitidis*, were identified in the genome and studied through heterologous expression in the *E. coli* KNabc, a strain lacking the major Na⁺/H⁺ antiporters. *N. meningitidis* Na⁺/H⁺ antiporters, were able to restore Na⁺ resistance to *E. coli* KNabc, suggesting that they may contribute to the Na⁺ and pH homeostasis. NmNhaE is also able to transport Li⁺ ions and appears to be the main Na⁺/H⁺ antiporter contributing to this role in *N. meningitidis*. The Na⁺/H⁺ antiporter activity of NmNhaE is active between pH 6.5 to 9, the optimal Na⁺(Li⁺)/H⁺ antiporter activity being observed at pH 7. Furthermore, NmNhaE displayed higher affinity towards Na⁺. To address important functional and structural residues in NmNhaE, ten amino acid residues were selected from sequence alignments comparisons and previous studies of site directed mutagenesis in other Na⁺/H⁺ antiporters and point mutations were introduced in the *nhaE* gene, resulting in E91Q, H161L, G174S, D182N, H201L, V258T, H272L, H356L, H361L and G413S mutations. When their expression was induced, all mutants but G174S and H201L, allowed *E. coli* KNabc strain it to grow in LBK with NaCl 500 mM. This suggests that mutations G174S and H201L may block the antiporter activity. No alteration was seen regarding the K_m measured for Na⁺ at pH 7 of mutants E91Q, V258T and H361L when compared to the NhaE wild type, however their V_{max} suffered a decrease of almost two times. In addition, the activities measured at pH 7 and 7.5 showed a decrease in V258T, while E91Q showed a decrease in activity at pH 7, when compared with the NhaE wild type. The determined kinetic parameters and the measured activities suggests that residues E91, V258, H361 may be involved in the pH response. The comparison between the NhaE kinetic parameters with those of the recombinant H272L showed almost one fold increase in the K_m for Na⁺ at pH 7, while the V_{max} showed no difference. The kinetic parameters and the activities measured at pH 7 and pH 7.5 suggests that residue H272 may be involved in the translocation of Na⁺ and also in pH response. No Na⁺/H⁺ antiporter activity was observed in the remaining residues. This work contributed for a better understanding of Na⁺ transport in *N. meningitidis* Nha Na⁺/H⁺ antiporters namely the function of Na⁺/H⁺ antiporters and important residues to their function. In the future, this work can provide useful information about the role of Na⁺ in the infection and survival of this bacterium in the host.

Keywords: *Neisseria meningitidis*; Na⁺/H⁺ Antiporters; NhaE; NhaC; Point mutations

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transporte membranar e transportadores de membrana	2
1.2. Transportadores de sódio	5
1.3. Antiporters Na ⁺ /H ⁺	7
1.3.1. Antiporters do tipo Nha.....	9
1.3.2. NhaE	11
1.4. <i>Neisseria meningitidis</i>	12
1.4.1. Estrutura, morfologia, biologia e patogenicidade	14
1.4.2. Transportadores de sódio em <i>N. meningitidis</i>	17
Objetivos	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Estirpes bacterianas e condições gerais de crescimento.....	20
2.2. Plasmídeo pISC-2	21
2.3. Introdução de mutações pontuais no gene <i>nmnhaE</i>	22
2.3.1. Seleção dos resíduos de aminoácidos.....	22
2.3.2. Construção de mutantes pontuais do gene codificante do NmNhaE.....	22
2.3.2.1. Desenho de primers e reação de PCR	23
2.3.2.2. Transformação em células competentes <i>E. coli</i> XL1blue	25
2.3.2.3. Extração e quantificação de DNA plasmídico	25
2.4. Experiências de complementação	26
2.4.1. Preparação de células competentes - Estirpe <i>E. coli</i> KNabc.....	26

2.4.2. Transformação em células competentes - Estirpe <i>E. coli</i> KNabc	26
2.4.3. Expressão e crescimento dos transformantes	27
2.5. Estudo da atividade de antiporter Na ⁺ /H ⁺	28
2.5.1. Preparação de vesículas invertidas	28
2.5.2. Determinação da quantidade de proteína	28
2.5.3. Determinação da actividade de antiporter Na ⁺ (Li ⁺)/H ⁺	29
3. RESULTADOS	31
3.1. Caracterização dos antiporters Na ⁺ /H ⁺ de <i>N. meningitidis</i>	34
3.1.1. Antiporter NhaC de <i>N. meningitidis</i>	34
3.1.1.1. Resistência ao Na ⁺ de <i>E. coli</i> KNabc onde foi induzida a expressão do NmNhaC	34
3.1.1.2. Atividade de Na ⁺ /H ⁺	36
3.1.2. Antiporter NhaE de <i>N. meningitidis</i>	37
3.1.2.1. Resistência ao Na ⁺ e Li ⁺ de <i>E. coli</i> KNabc onde foi induzida a expressão do NmNhaE.....	37
3.1.2.2. Caracterização cinética do transporte de iões Na ⁺ e Li ⁺	39
3.1.2.3. Variação da atividade de antiporter Na ⁺ (Li ⁺)/H ⁺ em função do pH....	41
3.1.3. Introdução de mutações pontuais no gene <i>nhaE</i> codificante do NmNhaE.....	43
3.1.3.1. Seleção de resíduos de aminoácidos.....	43
3.1.4. Análise dos mutantes pontuais do NmNhaE	50
3.1.4.1. Resistência ao Na ⁺	50
3.1.4.2. Caracterização cinética dos mutantes pontuais do NmNhaE.....	51
3.1.4.3. Efeito das mutações na resposta do NmNhaE ao pH.....	55
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	57
4.1. Discussão.....	58
4.1.1. Expressão dos antiporters NmNhaC e NmNhaE em <i>E. coli</i> KNabc	58
4.1.2. Atividade de antiporter Na ⁺ /H ⁺ em vesículas invertidas de <i>E. coli</i> KNabc...59	59

4.1.3. Papel dos resíduos mutados no NmNhaE.....	60
4.2. Conclusões e considerações finais	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS.....	79
Anexo 1	80
Anexo 2	83
Anexo 3	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte de íões através da membrana	4
Figura 2. Representação do transporte de Na ⁺ e de H ⁺ que ocorrem em algumas membranas bacterianas	6
Figura 3. Antiporters Na ⁺ /H ⁺ NhaA e NhaB de <i>E. coli</i>	10
Figura 4. Estrutura do NhaA de <i>E. coli</i>	11
Figura 5. Distribuição da doença meningocócica por serogrupo e por região	14
Figura 6. Alguns elementos estruturais existentes em <i>N. meningitidis</i>	16
Figura 7. Representação do plasmideo pISC-2 usado neste trabalho	21
Figura 8. Método de mutagénese dirigida aplicado neste trabalho	23
Figura 9. Representação ilustrativa da relação entre vários antiporters do tipo Nha distribuídos em diferentes grupos	32
Figura 10. Representação gráfica da resistência de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão do NmNhaC foi induzida, em meio LBK com NaCl.....	35
Figura 11. Ensaio da atividade de transporte Na ⁺ em vesículas invertidas de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão do NmNhaC foi induzida	36
Figura 12. Representação gráfica da resistência de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida, em meio líquido, pH 7, com NaCl e LiCl.....	38
Figura 13. Representação gráfica da resistência de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida, em meio líquido, com elevadas concentrações de NaCl, a diferentes valores de pH	38
Figura 14. Caracterização cinética do NmNhaE.....	40
Figura 15. Representação gráfica da variação da atividade do NmNhaE de acordo com o pH e com a adição de 4 mM de NaCl em vesículas invertidas de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida	42
Figura 16. Representação gráfica da variação da atividade do NmNhaE de acordo com o pH.....	42

Figura 17. Alinhamento entre sequências de aminoácidos do NmNhaE e outros antiporters Na ⁺ /H ⁺ de vários grupos do tipo Nha	45
Figura 18. Comparação entre sequências de aminoácidos do NmNhaE e algumas sequências similares consideradas hipotéticos NhaEs	46
Figura 19. Representação da topologia do NmNhaE, com 11 TMS, calculado pelo programa TopCons	47
Figura 20. Representação gráfica da resistência de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão dos mutantes do NmNhaE foi induzida, em meio líquido com NaCl a diferentes valores de pH.....	51
Figura 21. Ensaio de transporte a pH 7, em vesículas invertidas de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão dos mutantes do NmNhaE foi induzida.....	52
Figura 22. Representações dos gráficos a partir do qual são calculados os parâmetros cinéticos	53
Figura 23. Representação gráfica da variação da atividade Na ⁺ /H ⁺ do NhaE e seus mutantes a pH 7 e 7.5.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Alguns transportadores de Na ⁺ de <i>N. meningitidis</i> MC58	17
Tabela 2. Composição dos meios utilizados para o crescimento das estirpes de <i>E. coli</i>	20
Tabela 3. Principais características dos primers selecionados e tipo de mutação que originam	24
Tabela 4. Programa de PCR utilizado para a introdução de mutações pontuais no gene <i>nmnhaE</i>	24
Tabela 5. Resistência ao Na ⁺ e Li ⁺ de <i>E. coli</i> KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida, em meio sólido a valores de pH 6.5, 7 e 8	39
Tabela 6. Parâmetros cinéticos do NmNhaE em <i>E. coli</i> KNabc, onde a expressão do NhaE foi previamente induzida	41
Tabela 7. Principais características dos 10 resíduos de aminoácidos selecionados para mutação no NhaE.....	49
Tabela 8. Parâmetros cinéticos dos mutantes pontuais do NhaE calculados para o Na ⁺	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
CCCP	carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona, do inglês, <i>carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone</i>
CPA	Antiporter Catião:Protão monovalente, do inglês, <i>CPA-monovalent cation:proton antiporter</i>
<i>E. coli</i> KNabc_pISC	<i>E. coli</i> KNabc transformada com o plasmídeo pISC-2
<i>E. coli</i> KNabc_pISCNhaE	<i>E. coli</i> KNabc transformada com o gene <i>nhaE</i> inserido no plasmídeo pISC-2
<i>E. coli</i> KNabc_pISCNhaC	<i>E. coli</i> KNabc transformada com o gene <i>nhaC</i> inserido no plasmídeo pISC-2
EcNhaA	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ , NhaA de <i>Escherichia coli</i>
HdNhaH	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ , NhaH de <i>Halobacillus danabensis</i>
<i>K_m</i>	Parâmetro cinético, Constante de ligação
LOS	Lipooligossacárido
LPS	Lipopolissacárido
Meio LB	Meio Luria Bertani
Meio LBK	Meio Luria Bertani modificado, NaCl substituído por 87 mM de KCl
Mrp	Antiporter de resistência múltipla e relacionada com o pH, do inglês, multiple resistance and pH-related antiporter
Na⁺-NQR	NADH: ubiquinona oxidoreductases transportadoras de Na ⁺ , do inglês, Na ⁺ -transporting NADH:ubiquinone oxidoreductase
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NhaA	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo A
NhaB	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo B
NhaC	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo C
NhaD	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo D

NhaE	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo E
NhaH	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo H
NhaP	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ do grupo P
<i>nmnhaC</i>	Gene codificante do NhaC de <i>Neisseria meningitidis</i>
NmNhaC	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ , NhaC de <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>nmnhaE</i>	Gene codificante do NhaE de <i>Neisseria meningitidis</i>
NmNhaE	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ , NhaE de <i>Neisseria meningitidis</i>
OD₆₀₀	Densidade ótica medida a 600 nm
ORF	Grelha de leitura aberta, do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
RmNhaE	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ , NhaE de <i>Rhodothermus marinus</i>
TMS	Segmentos transmembranares
VcNhaD	Antiporter Na ⁺ /H ⁺ , NhaD de <i>Vibrio cholerae</i>
<i>V_{max}</i>	Parâmetro cinético, Velocidade máxima

INTRODUÇÃO

A capacidade das células produzirem energia é vital para a sua existência, sendo necessária a presença de mecanismos intracelulares nas células capazes de conservar esta energia. Geralmente, obtém-se energia através de nutrientes que estão disponíveis no ambiente à volta da célula, nomeadamente o uso de compostos orgânicos como fonte de carbono, a energia proveniente do sol, ou até mesmo a energia proveniente de gradientes iónicos. A energia adquirida é empregue na síntese de macromoléculas, a partir de precursores mais simples e poderá servir também para converter energia química em gradientes de concentração e gradientes iónicos, necessários para o metabolismo celular ou até para a motilidade da célula.

Sendo o ião sódio (Na^+) um dos mais utilizados para estabelecer gradientes de concentração e iónicos, capazes de produzir energia, e considerando o seu importante papel na fisiologia celular, bem como também na sua associação à virulência de algumas bactérias patogénicas (Häse *et al.* 2001), torna-se portanto relevante o conhecimento dos mecanismos que envolvem o transporte deste ião nas células. Neste caso em particular, o estudo de antiporters Na^+/H^+ no microorganismo patogénico *Neisseria meningitidis*, foi desenvolvido para uma melhor compreensão do transporte do ião Na^+ , bem como de muitos aspectos importantes na infeção e na sua sobrevivência no hospedeiro.

1.1. Transporte membranar e transportadores de membrana

A membrana celular possui diversas funções na célula, incluindo compartimentalização, transporte, transdução de sinal, catálise enzimática e criação de gradientes transmembranares de solutos. Uma das suas principais funções é a de constituir uma barreira para o meio exterior, controlando a entrada e saída de algumas moléculas e iões (Yeagle, 2001; Zaydman *et al.* 2012). Certas moléculas não polares são capazes de atravessar a membrana livremente, já outras, moléculas polares e iões, necessitam de um transporte mais específico, realizado através de proteínas que se encontram associadas à membrana. Tais proteínas membranares, ao contrário das proteínas solúveis, possuem a maioria dos aminoácidos hidrofóbicos no seu interior,

formando hélices, que se situam no interior hidrofóbico da bicamada lipídica (Yeagle, 2001). Para além da função de transporte transmembranar estas proteínas possuem também um papel importante na bioenergética e na sinalização celular (Robertson *et al.* 2012). Os constituintes lipídicos e o efeito hidrofóbico que suportam a estrutura em bicamada lipídica da membrana celular não permitem a passagem de solutos, a não ser por estas proteínas associadas (Yeagle, 2001).

O transporte dos solutos ocorre através de proteínas de transporte ou através de canais iónicos, podendo também, para determinadas moléculas, ocorrer livremente pela membrana. Desta forma, o transporte pode ser de dois tipos, passivo e ativo (Figura 1.A). O transporte passivo ocorre quando os solutos atravessam a membrana através do seu gradiente de concentração, e pode ser efectuado por difusão simples (Figura 1.A1) ou por difusão facilitada (Figura 1.A2). A difusão simples ocorre quando uma molécula pequena atravessa a membrana, a favor do seu gradiente de concentração, em geral lentamente. A difusão facilitada é dependente de uma proteína membranar, de modo que o soluto, que não consegue atravessar a membrana livremente, o faça através do auxílio da proteína. O movimento do soluto é novamente a favor do seu gradiente de concentração. Por outro lado, o transporte ativo é observado quando o soluto é transportado através da membrana, desta vez contra o gradiente de concentração, com a utilização de energia celular (Figura 1.A3). O transporte de iões depende de dois factores, o gradiente de concentração e o potencial eléctrico. O transporte pode envolver mais do que um soluto (Figura 1.B). Um transportador que apenas transporta um soluto é denominado de uniporter (Figura 1.B1), enquanto que, um transportador que transporta mais do que um soluto é chamado de co-transporter. Este último, também pode ser denominado de symporter (Figura 1.B2) ou de antiporter (Figura 1.B3), consoante o transporte dos solutos seja efectuado no mesmo sentido ou em sentidos opostos, respetivamente. Existem dois tipos de transporte ativo. i) o transporte ativo primário, que usa energia química, derivada do ATP ou de qualquer outro composto químico rico em energia, ou até de reações de oxidação. ii) o transporte ativo secundário, que usa a energia de um soluto que é transportado a favor do seu gradiente de concentração, para promover o transporte do outro soluto contra o seu gradiente de concentração. Normalmente, o gradiente de concentração formado inicialmente, é obtido por transporte ativo primário (Nicholls & Ferguson, 2002; Nelson & Cox, 2005).

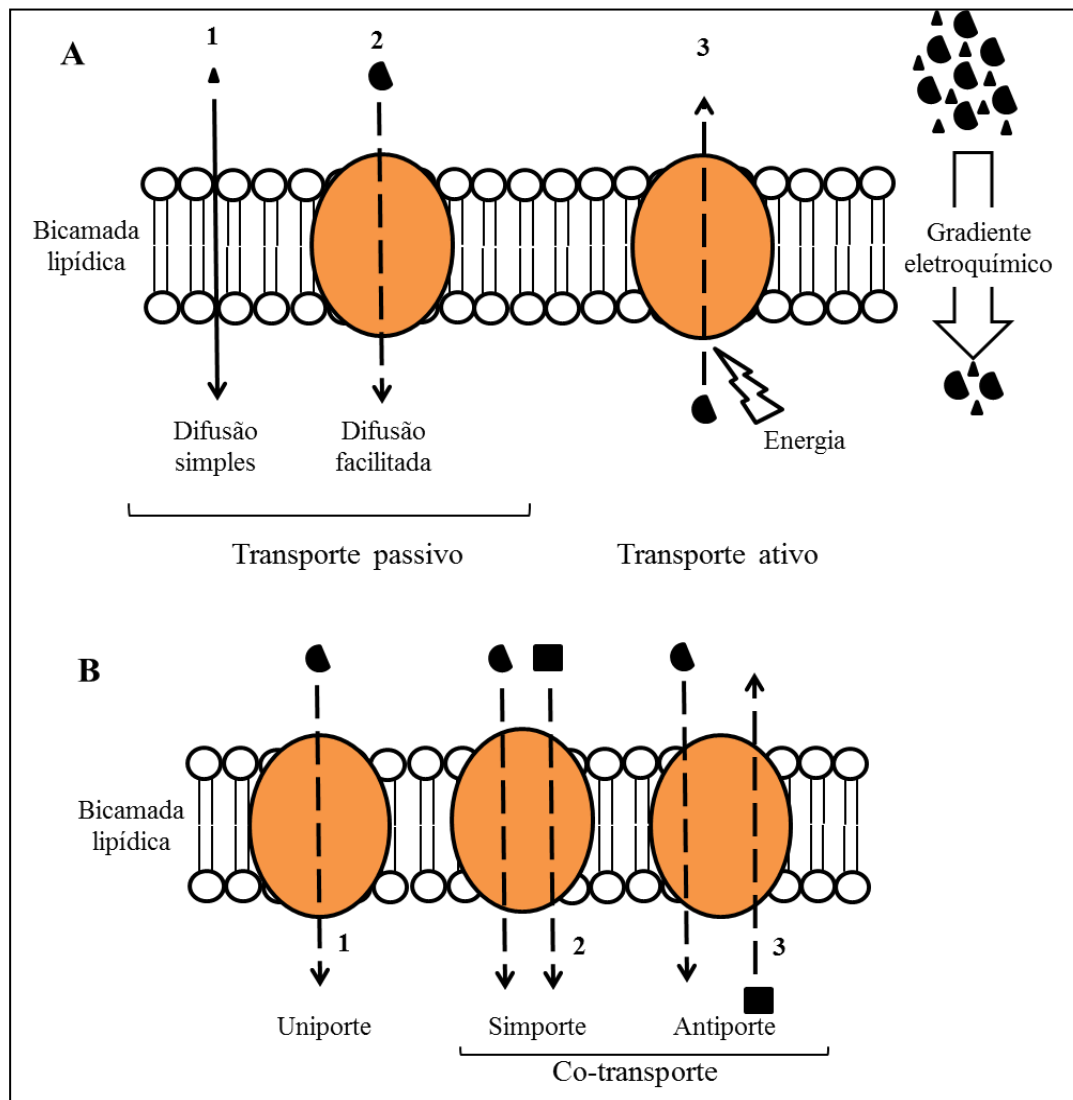


Figura 1. Transporte de íons através da membrana. **A-** Transporte ativo e passivo. **B-** Transporte de uma ou mais moléculas.

Existem por outro lado moléculas que não são transportadores, mas que facilitam o transporte ligando-se a íons, os chamados ionóforos, como o CCCP, carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (do inglês, *carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone*). O transporte de moléculas carregadas ou íons pode fazer com que se acumule carga na membrana. Quando existe criação de um potencial elétrico de membrana o transporte é denominado eletrogénico, ou seja, existe uma distribuição desigual de íons nos dois lados da membrana. Por outro lado, quando a carga elétrica é nula, o transporte é eletroneutro. Isto tanto pode ocorrer quando há uniporte de uma espécie não carregada, simporte de dois íons com cargas opostas, ou antiporte de dois íons com a mesma carga (Nicholls & Ferguson, 2002; Nelson & Cox, 2005).

1.2. Transportadores de sódio

As bactérias estão expostas a variadíssimas condições ambientais. Particularmente as espécies patogênicas, que têm de lidar com diferentes condições, tanto dentro como fora do hospedeiro. Para isso, todas as células usam mecanismos homeostáticos para se ajustarem a mudanças de pH e força iônica extracelulares. Normalmente, a maioria das bactérias utilizam a força motriz prótonica como fonte de energia para os vários processos celulares (Häse *et al.* 2001). Contudo, alguns microrganismos podem utilizar o Na^+ como íon quimiosmótico, num ciclo de Na^+ , em vez de usarem prótons (Skulachev, 1989; Dimroth, 1994; Häse *et al.* 2001). A utilização do transporte de Na^+ não impossibilita o funcionamento do transporte de próton (H^+) em combinado (Figura 2). Um ciclo de Na^+ totalmente operacional necessita de uma bomba de Na^+ , de uma ATP-sintase dependentes de Na^+ , alguns transportadores de membrana dependentes de Na^+ e também motores flagelares dependentes de Na^+ (Häse *et al.* 2001) (Figura 2). Uma das bombas de Na^+ normalmente encontradas neste tipo de organismos são as NADH: ubiquinona oxidoreductases transportadoras de Na^+ (Na^+ -NQR), (do inglês, Na^+ -transporting NADH:ubiquinone oxidoreductase). A Na^+ -NQR foi primeiramente descoberta em *Vibrio alginolyticus* (Tokuda & Unemoto, 1984) tendo posteriormente sido encontrada em *Vibrio cholerae*, onde se verificou que mutações no operão da Na^+ -*nqr* aumentam a expressão de fatores de virulência (Häse & Mekalanos, 1999). Esta proteína é composta por seis subunidades, codificadas pelo operão Na^+ -*nqr* (Bogachev & Verkhovsky, 2005), e a sua função é fornecer elétrons à cadeia respiratória através da oxidação do NADH, utilizando a energia proveniente desta reação, para translocar Na^+ para o espaço periplasmático (Häse *et al.* 2001; Bogachev & Verkhovsky, 2005). Outras bombas de Na^+ , igualmente importantes são as dicarboxilato descarboxilases dependentes de Na^+ (do inglês, Na^+ -transporting dicarboxylate decarboxilases), que utilizam a descarboxilação do oxaloacetato para promover a saída de Na^+ do citoplasma, e também as bombas de Na^+ dependentes de ATP, que usam o ATP para promover gradientes de Na^+ (Dimroth, 1994). Estes gradientes de Na^+ , podem posteriormente ser usados pelas ATP-sintases dependentes de Na^+ para o organismo sintetizar ATP (Dimroth, 1994). Além disso, a força motriz de Na^+ também pode ser usada por transportadores secundários para obtenção de solutos, como acontece no caso

de symporters, ou para converter força motriz de Na^+ em força motriz protónica, como no caso dos antiporters Na^+/H^+ (Häse *et al.* 2001). A conversão destes gradientes por antiporters Na^+/H^+ mostra que o transporte de Na^+ e de H^+ estão interligados (Figura 2). Ainda, os gradientes de Na^+ podem ser utilizados por algumas bactérias na sua motilidade, através de motores flagelares. De facto, a perda de motilidade já foi relacionada com redução da virulência em algumas bactérias como é o caso de *V. cholerae* e *Helicobacter pylori* (Häse *et al.* 2001).

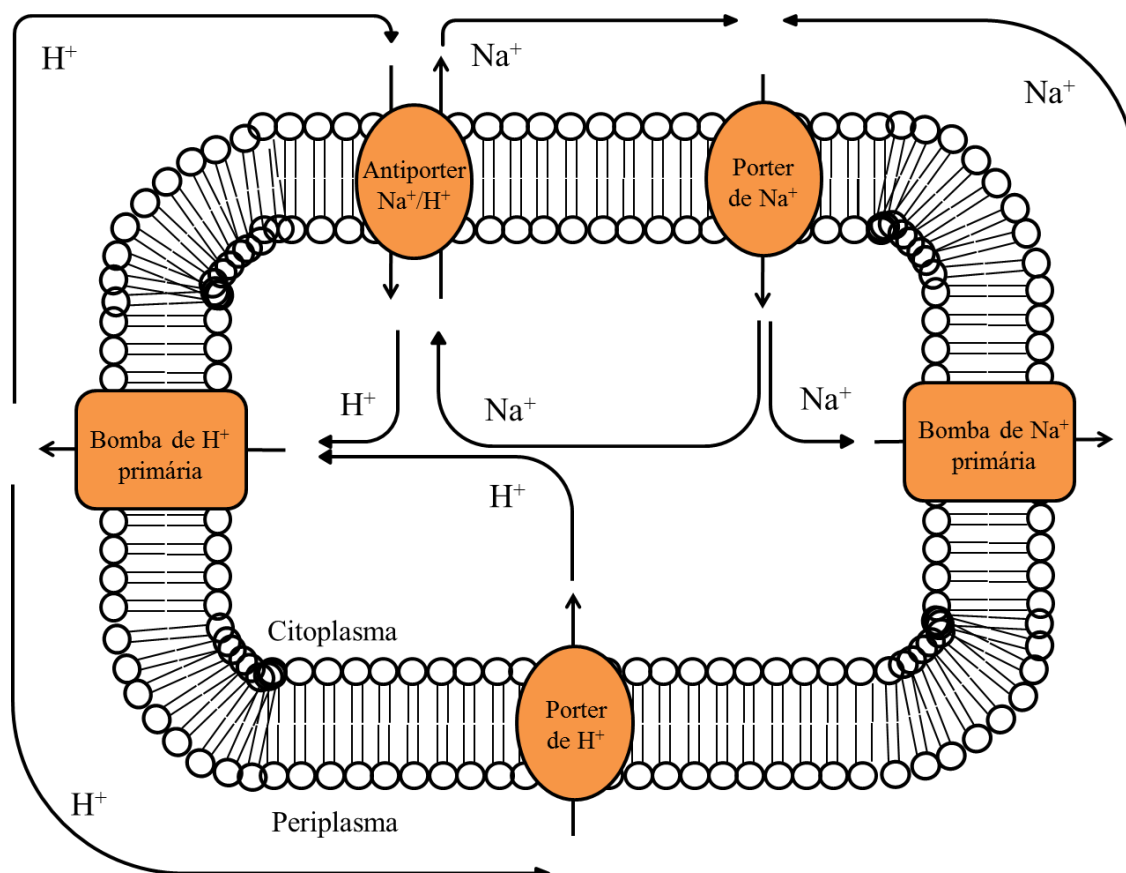


Figura 2. Representação do transporte de Na^+ e de H^+ que ocorre em algumas membranas bacterianas. A bomba de Na^+ e bomba de H^+ são os geradores de força motriz (Na^+ -NQR, dicarboxilato descarboxilases dependentes de Na^+ , bombas translocadoras de H^+ da cadeia respiratória). Os Porters de Na^+ e H^+ indicam os utilizadores da força motriz gerada pelas bombas (symporters, motores flagelares, ATP-sintases dependentes de Na^+). Os antiporters Na^+/H^+ convertem a força motriz de Na^+ em força motriz de H^+ e vice versa.

1.3. Antiporters Na⁺/H⁺

Os antiporters Na⁺/H⁺ são proteínas integrais de membrana, que estão envolvidas na bioenergética celular. Estas proteínas são transportadores ativos secundários, que utilizam a energia proveniente da força protomotriz, formada por transportadores de H⁺ primários, para expelir o Na⁺ para fora das células (Padan & Schuldiner, 1994; Padan *et al.* 2001; Dzioba *et al.* 2002; Krulwich *et al.* 2011). São por isso importantes para a fisiologia celular, no que diz respeito à regulação do pH intracelular, a regulação do Na⁺ e também do volume celular, (Padan & Schuldiner, 1993; Padan *et al.* 2001; Padan *et al.* 2004; Padan, 2008). Contudo, a variação na concentração destes íons pode fazer com que estes se tornem prejudiciais às células (Padan *et al.* 2001). Em 1974, P. Mitchell e seus colaboradores, descobriram os antiporters Na⁺/H⁺ na bactéria *Escherichia coli*, tendo sugerido que desempenhavam papéis na homeostasia da célula (West & Mitchell, 1974). Os antiporters Na⁺/H⁺ podem ser encontrados nas membranas citoplasmáticas e em membranas de organelos de vários microrganismos, plantas, e animais, incluindo o homem (Padan *et al.* 2001. Padan *et al.* 2004; Krulwich *et al.* 2011). Além do Na⁺, alguns antiporters Na⁺/H⁺ são também capazes de transportar o íon lítio (Li⁺) para o exterior, como por exemplo, o NhaA de *E. coli* (EcNhaA) (Padan *et al.* 2004) e os NhaA e NhaD de *V. cholerae* (VcNhaD) (Herz *et al.* 2003). Visto que os íons Na⁺ e Li⁺ são tóxicos para a célula, principalmente o íon Li⁺, estes antiporters também possuem um papel crucial no combate à toxicidade destes íons nas células (Padan & Schuldiner, 1993; Padan *et al.* 2005).

A base de dados criada por Milton Saier para classificar proteínas, a *Transporter Classification Database*, inseriu os antiporters Na⁺/H⁺ na superfamília CPA, Antiporter Catião:Protão monovalente (do inglês, *CPA-monovalent cation:proton antiporter*) (Chang *et al.* 2004). A superfamília CPA é subdividida em três famílias, a CPA1, Antiporter Catião:Protão-1 (do inglês, *Monovalent Cation:Proton Antiporter-1*), a CPA2 Antiporter Catião:Protão-2 (do inglês, *Monovalent Cation:Proton Antiporter-2*) e NaT-DC, Carboxilase de Ácido Carboxílico transportadora de Na⁺ (do inglês, *Na⁺-transporting Carboxylic Acid Decarboxylase*) (Chang *et al.* 2004). Atualmente, as famílias MSS, Simporter Malonato: Na⁺ (do inglês, *Malonate:Na⁺ Symporter*) e PSE, Exporter de Sulfato Putativo (do inglês, *Putative Sulfate Exporter*) também fazem parte

desta superfamília (Saier *et al.* 2006, 2009 - *Transporter Classification Database*, 2013).

Nos organismos procariontes, existem contudo dois tipos diferentes de antiporters Na^+/H^+ . Os codificados por vários genes, denominados Mrp (Swartz *et al.* 2005), e os codificados por apenas um gene, chamados Nha. Ambos desempenham funções semelhantes na célula, embora existam algumas diferenças entre eles.

Os antiporters do tipo Mrp, antiporter de resistência múltipla e relacionada com o pH (do inglês, *multiple resistance and pH-related antiporter*), distinguem-se dos antiporters do tipo Nha principalmente por serem codificados em operões, originando seis ou sete proteínas hidrofóbicas diferentes, que funcionam como hétero-oligómeros (Hiramatsu *et al.* 1998; Swartz *et al.* 2005; Morino *et al.* 2010). Os operões *mrp* estão organizados em dois grupos, Grupo 1 e Grupo 2. No Grupo 1 a ordem dos genes é *mrpABCDEFG* e no Grupo 2 é *mrpA'CDEFG*. Neste último grupo, os primeiros dois genes, *mrpA* e um domínio do *mrpB* estão fundidos, dando origem ao *mrpA'*. Os sistemas Mrp foram primeiramente identificados em *Bacillus halodurans* C-125 (Kudo *et al.* 1990), tendo posteriormente sido identificados em diversos organismos, e em alguns casos tendo sido designados de outra forma, como são os casos do Mnh de *Staphylococcus aureus* (Hiramatsu *et al.* 1998), o Sha *Bacillus subtilis* (Ito *et al.* 1999), e o Sha de *Pseudomonas aeruginosa* (Kosono *et al.* 2005). Mais recentemente confirmou-se a existência de um sistema Mrp em *V. cholerae* (Dzioba-Winogrodzki *et al.* 2009). Existe muito pouca similaridade entre as proteínas Mrp e outros antiporters. Contudo as proteínas MrpA, MrpC e MrpD demonstram alguma similaridade com subunidades da NADH:quinona oxidoreductase (Complexo I) da cadeia respiratória aeróbia (Swartz *et al.* 2005). Este tipo de antiporters, além de translocarem Na^+ e Li^+ , podem também permutar potássio (K^+) por H^+ . Foi também verificado em *S. aureus* (Hiramatsu *et al.* 1998) e *B. subtilis* (Ito *et al.* 2000) que todos os genes do operão são necessários para que haja resistência ao Na^+ . Devido às propriedades distintas, os sistemas Mrp foram inseridos numa categoria diferente de classificação, a família CPA3, Antiporter Catião:Protão-3 (do inglês, *cation:proton antiporter-3*) (Saier *et al.* 1999).

Os mamíferos possuem uma família de antiporters Na^+/H^+ denominada NHE, na qual existe um homólogo ao NhaA de *E. coli*, no homem denominado de NHA (Xiang *et al.* 2007). Foi demonstrado que a disfunção de NHE dá origem a várias doenças, incluindo hipertensão, diarreia, epilepsia, arritmias do miocárdio, entre outras (Xiang *et al.* 2007).

1.3.1. Antiporters do tipo Nha

Os antiporters do tipo Nha são codificados por um único gene, tendo já sido identificados vários grupos de Nha em diferentes organismos. Como é caso do NhaA, identificado em *E. coli* (Karpel *et al.* 1988), *V. cholerae* (Vimont & Berche, 2000), *H. pylori* (HpNhaA) (Inoue *et al.* 1999). O NhaB, existente em *E. coli* (Pinner *et al.* 1992), *V. cholerae* (Herz *et al.* 2003) e também em *V. alginolyticus* (Nakamura *et al.* 1996). O NhaC, identificado em *Bacillus firmus* OF4 (Ito *et al.* 1997). O NhaD, existente em *V. cholerae* (Dzioba *et al.* 2002), *Vibrio parahaemolyticus* (Nokazi *et al.* 1998) e *Halomonas elongata* (Kurz *et al.* 2006). Também os grupos NhaP de *P. aeruginosa* (Utsugi *et al.* 1998) NhaG de *B. subtilis* ATCC (Gouda *et al.* 2001), NapA de *Enterococcus hirae* (Waser *et al.* 1992), NhaH de *Halobacillus dabanensis* (Yang *et al.* 2006), NhaE de *Rhodotermus marinus* (Melo *et al.* 2006) e mais recentemente o NhaE de *N. meningitidis* (Sousa *et al.* 2013).

Até a data, o EcNhaA é o antiporter mais estudado, e o único cuja estrutura foi resolvida (Hunte *et al.* 2005). Várias estirpes de *E. coli* têm vindo a ser deletadas nos genes *nhaA* e *nhaB*, para permitir a caracterização heteróloga de outros antiporters nesta bactéria. São exemplos destas estirpes a NM81, em que o *nhaA* está ausente, EP431, deletada no *nhaB*, EP432 deficiente nos genes *nhaA* e *nhaB* e KNabc deletada nos genes *nhaA*, *nhaB* e *chaA* (Padan *et al.* 2001). Estudos nos dois antiporters de *E. coli* revelaram que são ambos electrogênicos, o NhaA tem uma estequiometria de $2\text{H}^+/\text{Na}^+$ (Padan *et al.* 2005) e o NhaB de $3\text{H}^+/2\text{Na}^+$ (Pinner *et al.* 1994) (Figura 3). Ambos trocam Na^+ ou Li^+ por H^+ , mas o NhaA é o principal antiporter responsável por tolerar valores elevados de pH em concentrações elevadas de Na^+ (Padan *et al.* 2001). Este antiporter revela uma grande dependência no pH. Sendo que, a atividade do NhaA varia

três ordens de magnitude, entre pH 7 e 8.5 (Tzuber *et al.* 2004; Padan *et al.* 2005). Estudos sobre o NhaA revelaram que a transcrição do gene *nhaA* é regulada pelo NhaR. O gene que codifica este regulador, o *nhaR*, está situado a jusante do *nhaA*, controlando a sua expressão na resposta a um aumento das concentrações de Na^+ ou Li^+ (Padan *et al.* 2001). Verificou-se também, um fenótipo hipersensitivo ao Na^+ , quando o *nhaR* é deletado, mesmo na presença do *nhaA* (Padan *et al.* 2001).

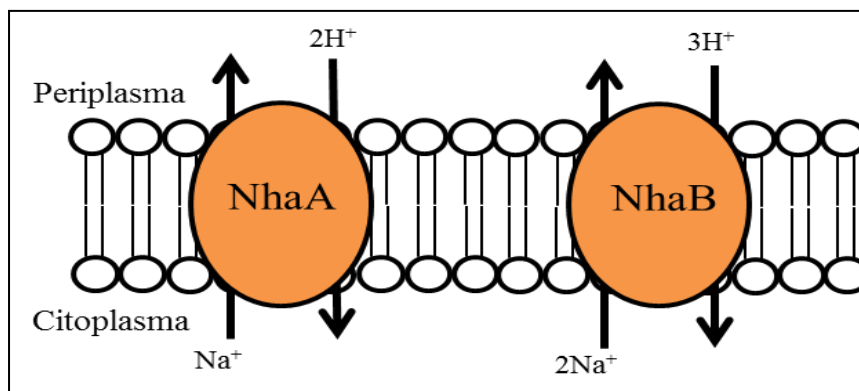


Figura 3. Antiporters Na^+/H^+ NhaA e NhaB de *E. coli* (Adaptado de Padan *et al.* 2001).

Estudos de microscopia eletrônica de varrimento revelaram que o NhaA de *E. coli* existe como um dímero em cristais 2D (Williams *et al.* 1999; Williams, 2000), e a sua estrutura secundária está organizada em 12 segmentos transmembranares (TMS) em cada monómero, tendo-se verificado mais tarde que este, existe na membrana como um homo-olígmero (Gerchman *et al.* 2001). A estrutura resolvida a pH 4 por raios-X (Figura 4.A), mostrou uma nova conformação no NhaA (Hunte *et al.* 2005). Os TMS IV e XI formam uma junção única (Figura 4.B), interrompidos por cadeias que se cruzam uma na outra, criando um ambiente propício à ligação de iões no centro da membrana, essencial para a translocação (Hunte *et al.* 2005; Padan *et al.* 2009). Além disso, a existência de dois funis carregados negativamente, um citoplasmático e outro periplasmático, facilita o acesso dos iões ao sítio de ligação putativo (Padan *et al.* 2009).

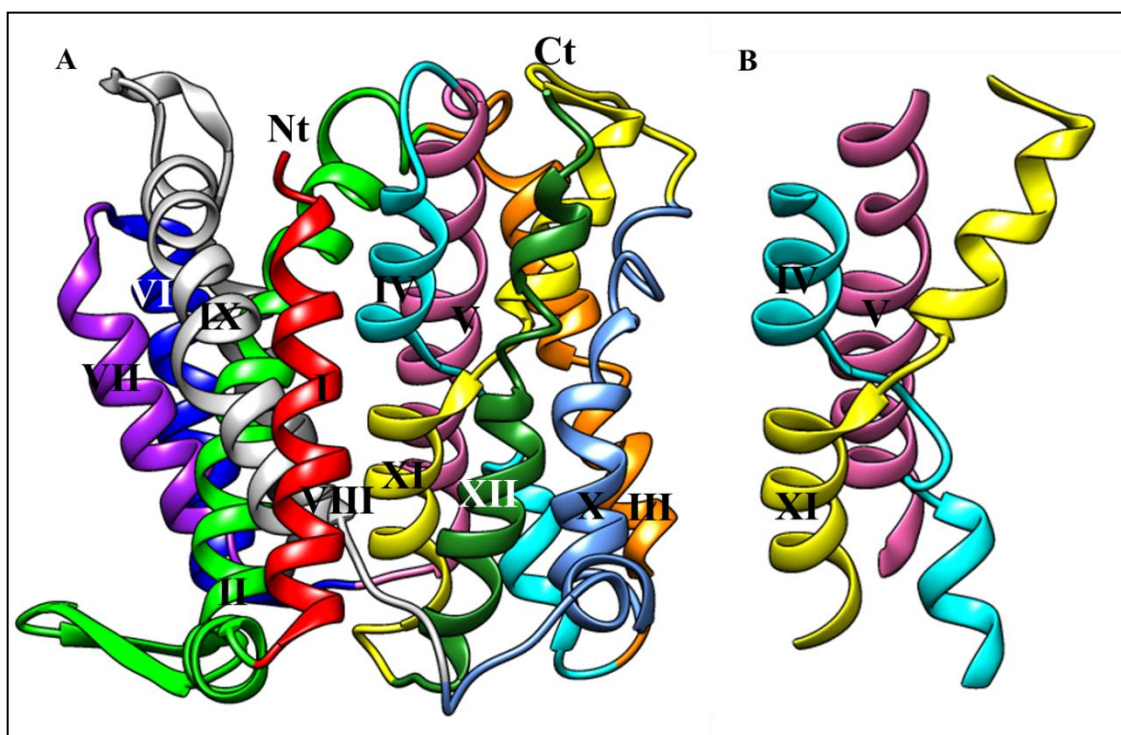


Figura 4. Estrutura do NhaA de *E. coli*. **A-** Visualização da estrutura do NhaA de *E. coli* em forma de fita. Os TMS estão numerados. Nt e Ct indicam o N e o C terminal. **B-** Junção única do TMS IV e XI, com o TMS V por detrás. Obtenção da estrutura através do RCSB *Protein Data Bank* (RCSB PDB). O tratamento da estrutura foi efetuado através do programa UCSF Chimera package. (Pettersen *et al.* 2004)

1.3.2. NhaE

Os antiporters do tipo NhaE foram pela primeira vez identificados em 2006, num estudo envolvendo um antiporter Na^+/H^+ de *R. marinus* (Melo *et al.* 2006). Ao contrário do NhaA de *E. coli*, o NhaE de *R. marinus* (RmNhaE) é capaz de conferir resistência ao Na^+ mas não ao Li^+ a células de *E. coli* deficiente em antiporters Na^+/H^+ , onde a expressão do NhaE de *R. marinus* foi induzida (Melo *et al.* 2006). A estirpe de *E. coli* onde a expressão do RmNhaE foi induzida, é capaz de crescer em pH 6.5 e 7.5 contudo a pH 8.5 já não consegue resistir ao NaCl, demonstrando que a sua atividade é dependente do pH do meio. A análise de sequências de aminoácidos realizada neste trabalho revelou a existência de outros antiporters Na^+/H^+ hipotéticos do tipo NhaE (Melo *et al.* 2006), como é o caso do NhaE de *N. meningitidis* (NmNhaE), que foi estudado e caracterizado no âmbito desta dissertação.

1.4. *Neisseria meningitidis*

N. meningitidis é um microrganismo patogénico, pertencente à família *Neisseriaceae* e ao género *Neisseria*, é uma bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbia, e encontra-se inserida no grupo das β -proteobactérias (Stephens, 2007; Rouphael & Stephens, 2012). A nível genómico, *N. meningitidis* tem entre 2 e 2.2 megabases, com cerca de 2000 genes, e com um conteúdo de GC comum, de 52%, possuindo uma grande plasticidade genómica, essencial para a evolução da bactéria (Tettelin *et al.* 2000; Schoen *et al.* 2007; Rouphael & Stephens, 2012). Possui como o seu único hospedeiro o homem, onde habita naturalmente a oro ou a nasofaringe (Yazdankhah & Caugant, 2004; Stephens, 2009). *N. meningitidis* é responsável por causar meningite em grande parte do mundo, principalmente em crianças e jovens (Rouphael & Stephens, 2012; Stephens, 2009). Pode também causar, pneumonia, artrite séptica, pericardite, bacteriemia crónica e conjuntivite embora menos frequentemente (Stephens, 2009).

Este microrganismo foi identificado e descrito pela primeira vez em 1887, por Weichselbaum, a partir de fluido cérebro espinal de um paciente com meningite (Weichselbaum, 1887; Bratcher *et al.* 2012; Rouphael & Stephens, 2012), quase 80 anos depois dos primeiros casos de epidemia de meningite na Suíça e nos Estados Unidos da América nos anos de 1805 e 1807, respetivamente (Stephens, 2009; Bratcher *et al.* 2012). Desde então, têm-se constatado inúmeros casos de meningite devido a infeções por *N. meningitidis*, que por outro lado pode viver no corpo humano sem causar qualquer dano (DeVoe, 1982; Gasparini *et al.* 2012). De facto, esta é a condição mais comum, uma vez que *N. meningitidis* tem com o seu hospedeiro uma relação quase de simbiose, ocorrendo ocasionalmente doença devido às suas próprias características de virulência ou devido a condições de baixa imunidade no homem (Gasparini *et al.* 2012). As diferenças encontradas na estrutura antigénica da cápsula polissacarídica originaram a classificação de *N. meningitidis* em diferentes serogrupos (Schoen *et al.* 2007; Stephens, 2009; Hill *et al.* 2010). Foram descritos até à data 13 serogrupos distintos, dos quais, apenas cinco estão associados a doença, os serogrupos A, B, C, Y e W-135 (Tettelin *et al.* 2000; Schoen *et al.* 2007; Hill *et al.* 2010; Bertrand *et al.* 2011; Bratcher *et al.* 2012).

A distribuição epidemiológica destes serogrupos encontra-se repartida por todo o globo (Figura 5), embora nem sempre seja uniforme em todas as zonas. Os padrões da doença variam ao longo do tempo e consoante as áreas geográficas, grupos etários e os diferentes serogrupos da bactéria. Geralmente ocorrem extensos casos de epidemia de meningite provocada por *N. meningitidis* em África, onde se situa a conhecida cintura da meningite, cujos casos identificados estão relacionados com o serogrupo A, mais presente neste continente. Em países em desenvolvimento esta doença é provocada, em grande parte, por *N. meningitidis* do serogrupo B, C e Y, nomeadamente nas Américas do Norte e Sul, Nova Zelândia e Europa. A introdução do conjugado de vacinas do serogrupo C na Europa diminuiu os casos da doença devido a este serogrupo, tendo-se verificado um aumento de casos de meningite meningocócica causados por *N. meningitidis* do serogrupo B. Na Ásia os extensos casos de meningite causada pelo serogrupo A foram substituídos por casos localizados de meningite devido aos serogrupos B e C. O serogrupo W-135 possui uma distribuição mais heterogénea, associado a episódios em diferentes regiões geográficas (Ferreira *et al.* 2006; Stephens, 2009; Halperin *et al.* 2012; Roupael & Stephens, 2012).

Em Portugal, esta bactéria é o agente causal de meningite principalmente em crianças. A epidemiologia deste organismo no país segue a distribuição da Europa, em que os serogrupos B, C, Y e W-135 prevalecem. De acordo com o que foi verificado na Europa, o serogrupo C causava grande parte da meningite meningocócica em Portugal até 2006. Neste mesmo ano, com a introdução da vacina conjugada do serogrupo C no programa nacional de vacinação, verificou-se que a doença provocada pelo serogrupo B teve um aumento no país (Ferreira *et al.* 2006; Santos *et al.* 2007; Simões *et al.* 2009).

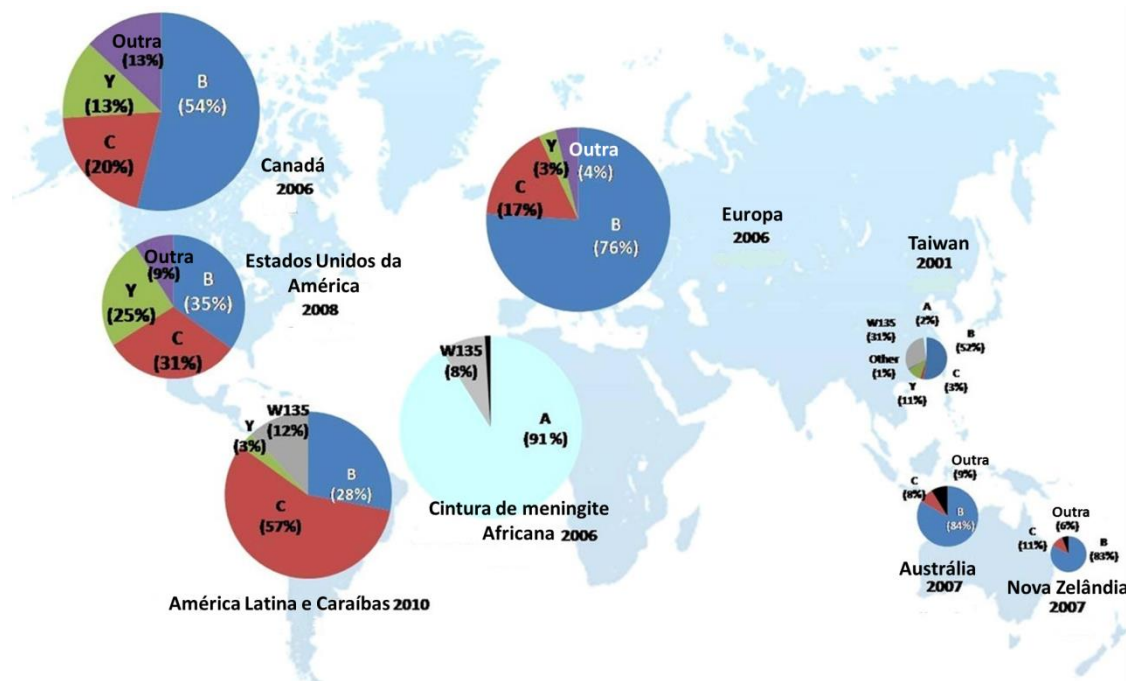


Figura 5. Distribuição da doença meningocócica por serogrupo e por região. (Adaptado de Halperin *et al.* 2012).

As várias tentativas para produzir uma vacina contra o serogrupo B de *N. meningitidis*, levaram a que *N. meningitidis* serogrupo B MC58 fosse o primeiro serogrupo de *N. meningitidis* a ter o seu genoma sequenciado (Tettelin *et al.* 2000), uma estirpe de laboratório derivada da estirpe ST-32, isolada de um surto em Inglaterra (Bratcher *et al.* 2012).

1.4.1. Estrutura, morfologia, biologia e patogenicidade

Normalmente possui a forma de um diplococcus, assemelhando-se a um feijão ou rim. É uma bactéria fastidiosa, cresce portanto em meios ricos como gelose-sangue, necessita de glucose, piruvato ou lactato como fonte única de carbono, e o seu crescimento ótimo verifica-se entre 35-37°C com uma percentagem de CO₂ de 5-10% (Rouphael & Stephens, 2012). Em termos classificativos a *N. meningitidis* pode ser classificada de acordo com a tipagem serológica, sendo dividida em serogrupos como já foi anteriormente referido. Pode ainda ser classificada em serosubtipo, serotipo e imunotipo, de acordo com as proteínas PorA, PorB, e a estrutura do lipoligossacárido (LOS), respetivamente (Bertrand *et al.* 2011; Bratcher *et al.* 2012).

A transmissão desta bactéria entre indivíduos dá-se por contacto direto, provavelmente através da inalação de gotículas de saliva contaminadas (Van Deuren *et al.* 2000; Stephens, 2009). O primeiro passo de colonização ocorre na nasofaringe, onde a maioria das adesinas têm um papel importante na adesão às células da mucosa, principalmente os pili. Estes facilitam a aderência da bactéria, sendo responsáveis pela aderência às células epiteliais, facilitando a absorção de DNA e também conferindo alguma mobilidade à bactéria. A maioria dos portadores do microrganismo não apresenta sintomas nesta fase de colonização (Stephens, 2009). Posteriormente, a ligação de outras adesinas importantes, as proteínas de opacidade, OPA (do inglês, *Opacity proteins*) (em *N. meningitidis* são expressas, Opa e Opc), vão facilitar a entrada da bactéria nas células epiteliais, onde outras adesinas têm também papéis importantes (Hill *et al.* 2010). *N. meningitidis* expressa duas porinas distintas PorA e PorB, facilitando a difusão de moléculas hidrofílicas pequenas. Apesar de não serem adesinas estas moléculas estão também envolvidas em interações hospedeiro-célula, sendo moléculas alvo de anticorpos (Hill *et al.* 2010; Rouphael & Stephens, 2012). A sobrevivência da bactéria na corrente sanguínea ocorre devido à sua capacidade de adquirir ferro do hospedeiro através de proteínas que ligam ferro, um fator de crescimento crucial durante a colonização e doença. O meningococos possui diversas proteínas com esta função, nomeadamente HmbR, proteína da membrana externa de adesão à hemoglobina (do inglês- Hemoglobin-Binding Outer Membrane Protein), as TbpA e TbpB, proteína de adesão à transferrina (Transferrin binding proteins) e as HbpA e HbpB, proteína de adesão ao hemo (do inglês, Hemin-binding protein) que se liga a lactoferrina, entre outras (DeVoe, 1982; Schoen *et al.* 2007; Hill *et al.* 2010; Rouphael & Stephens, 2012). Outra estrutura que permite a sobrevivência da bactéria no sangue é a capsula polissacarídica (Figura 6), uma vez que inibe a fagocitose e possui um papel importante na resistência a anticorpos e ao sistema complemento (Van Deuren *et al.* 2000; Stephens 2009; Hill *et al.* 2010; Rouphael & Stephens, 2012). A presença de alguns derivados de ácido siálico na cápsula tornam *N. meningitidis* invisível ao sistema imunitário, isso é particularmente visível na cápsula do serogrupo B, em que o homopolímero de ligação- α (2-8), idêntico a uma molécula de adesão fetal humana, tem uma fraca resposta imunitária (Rouphael & Stephens, 2012). Ainda pode ocorrer um fenómeno de variação de fase, uma vez que as semelhanças genéticas nas estruturas

dos *loci* das cápsulas, principalmente nos serogrupos B, C, W e Y podem favorecer a transferência horizontal de porções do operão da cápsula (Hill *et al.* 2010), facilitando assim a evasão ao sistema imunitário. Uma vez na corrente sanguínea, o lipopolissacárido (LPS) ou o lipooligossacárido também desempenha um papel importante na evasão ao sistema imunitário. Além disso, o LPS (Figura 6) existente na membrana é importante na adesão da bactéria. Esta pode-se multiplicar rapidamente e ultrapassar a barreira hemato-encefálica, causando meningite. Contudo, a doença invasiva só ocorre se houver a junção de vários fatores, tanto os fatores de virulência de *N. meningitidis*, como fatores ambientais, estando também dependente da suscetibilidade do hospedeiro (Stephens, 2009).

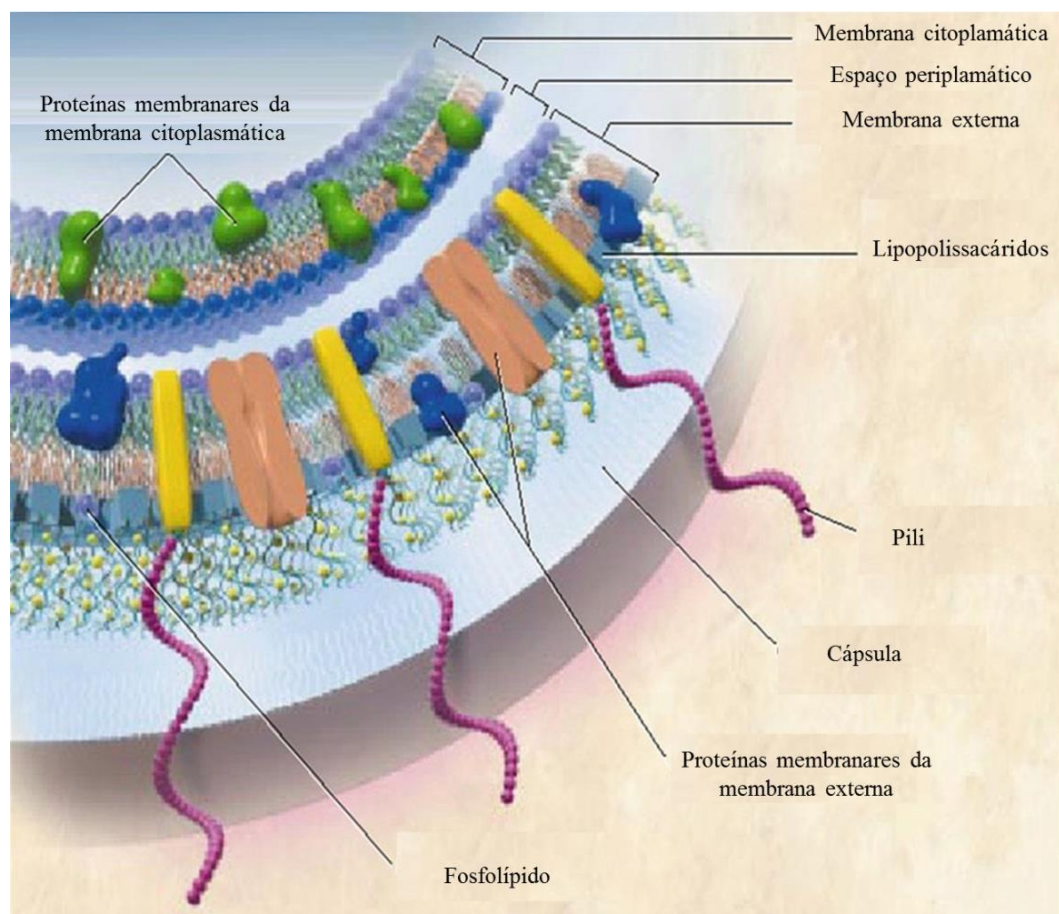


Figura 6. Alguns elementos estruturais existentes em *N. meningitidis*. (Adaptado de Rouphael & Stephens, 2012).

1.4.2. Transportadores de sódio em *N. meningitidis*

No genoma de *N. meningitidis* existem várias ORFs, grelha de leitura aberta (do inglês, *Open Reading Frames*) codificantes de potenciais transportadores de Na^+ (Tabela 1). Em *N. meningitidis* o transporte de Na^+ é bastante evidente uma vez que este microrganismo codifica alguns transportadores utilizados no ciclo de Na^+ . Encontra-se pelo menos um operão correspondente a seis ORFs de uma bomba de sódio, a Na^+ -NQR (Häse *et al.* 2001). Também se verificam algumas ORFs correspondentes a transportadores secundários dependentes de Na^+ . Simporters dependentes de Na^+ para os aminoácidos alanina, ácido glutâmico, prolina e serina (Häse *et al.* 2001). Antiporters Na^+/H^+ , NhaC e NhaE (Melo *et al.* 2006), estudados neste trabalho, e o último caracterizado (Sousa *et al.* 2013).

Tabela 1. Alguns transportadores de Na^+ de *N. meningitidis* MC58. Os transportadores foram encontrados no cmr.jcvi.org na ferramenta de *gene search*.

Locus	Nome do gene	Função	Classe
NMB0564	<i>nqrF</i>		
NMB0565	<i>nqrE</i>		
NMB0566	<i>nqrD</i>	NADH: ubiquinona oxidoreductase transportadora de Na^+	Transportador de Na^+ primário
NMB0567	<i>nqrC</i>		
NMB0568	<i>nqrB</i>		
NMB0569	<i>nqrA</i>		
NMB0536	<i>nhaC</i>	Antiporters Na^+/H^+	
NMB0570	<i>nhaE</i>		
NMB0402	<i>putP</i>	Simporter de prolina dependente Na^+	
NMB0177	<i>alsT</i>	Simporter de alanina dependente Na^+	Transportador de Na^+ secundário
NMB0085	<i>gltS</i>	Simporter de ácido glutâmico dependente Na^+	
NMB2133	<i>sstT</i>	Simporter de serina dependente Na^+	

Objetivos

Sendo a *N. meningitidis* um organismo patogénico, principal causador de meningite em crianças, principalmente na África subsariana, e o serogrupo B o mais prevalente na Europa, esta dissertação teve como principal objetivo a caracterização funcional de dois antiporters Na^+/H^+ encontrados no genoma de *N. meningitidis* serogrupo B MC58, NhaC e NhaE, e ainda, a verificação de resíduos importantes na função de um dos transportadores encontrados, o NmNhaE.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- 1) Expressão dos dois antiporters Na^+/H^+ , separadamente, numa estirpe deficiente em antiporters Na^+/H^+ , *E. coli* KNabc, e verificação da sua resistência ao NaCl e LiCl.
- 2) Verificação da atividade de antiporter Na^+/H^+ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde os dois antiporters Na^+/H^+ foram previamente expressos, em separado.
- 3) Determinação da constante de ligação (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) nos dois antiporters Na^+/H^+ para os iões Na^+ e Li^+ .
- 4) Determinação dos perfis de pH nos dois antiporters Na^+/H^+ para os iões Na^+ e Li^+ .
- 5) Inserção de mutações pontuais no gene que codifica o NhaE.
- 6) Expressão dos mutantes pontuais do NhaE, separadamente, numa estirpe deficiente em antiporters Na^+/H^+ , *E. coli* KNabc, e verificação da sua resistência ao NaCl.
- 7) Verificação da atividade de antiporter Na^+/H^+ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde os mutantes pontuais do NhaE foram previamente expressos, em separado.
- 8) Determinação do K_m e V_{max} nos mutantes pontuais do NhaE para o Na^+ .
- 9) Determinação dos perfis de pH nos mutantes pontuais do NhaE para o Na^+ .

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estirpes bacterianas e condições gerais de crescimento

As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo foram *E. coli* XL1blue, estirpe ideal para clonagens visto que aumenta a qualidade de DNA proveniente de minipreps, melhora a estabilidade do inserto e permite que o DNA clonado não seja clivado (XL1-Blue *Competent Cells*, catálogo 200249-11), *E. coli* KNabc, uma estirpe onde os três antiporters Na^+/H^+ foram inativados (NhaA, NhaB e ChaA) (Nozaki *et al.* 1996) e *E. coli* K-12.

Quando usadas, *E. coli* XL1blue e *E. coli* K-12 cresceram em meio Luria Bertani (LB) (Tabela 2), sólido ou líquido, e suplementado com ampicilina (ROTH), a uma concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$. *E. coli* KNabc, foi crescida em meio LBK (Tabela 2), sólido ou líquido, preferencialmente a pH 7, mas também submetida a crescimento com outros pHs, e igualmente suplementado com ampicilina, a uma concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 2. Composição dos meios utilizados para o crescimento das estirpes de *E. coli*.

Reagentes	LB (g)	LBK* (g)
Triptona (ROTH)	1	1
Extrato de levedura (ROTH)	0.5	0.5
NaCl (Panreac)	1	-
TRIS 50 mM (ROTH)	-	0,606
KCl 87 mM (Sigma)	-	0,649

A massa dos reagentes é referente a 100 ml de cada meio; *LBK - meio LB modificado em que o NaCl é substituído por 87 mM de KCl.

As estirpes cresceram à temperatura de 37°C, 150 rpm. Efetuaram-se variações das condições de crescimento consoante o protocolo utilizado que são descritas nas legendas das figuras das respectivas experiências.

2.2. Plasmídeo pISC-2

O plasmídeo pISC-2 (Vorburger *et al.* 2009) (Figura 7) foi utilizado neste trabalho como vetor de clonagem e expressão dos antiporters Na⁺/H⁺ NhaE e NhaC de *N. meningitidis*, por ser um plasmídeo adequado à expressão de proteínas membranares. Este plasmídeo é derivado do plasmídeo pBBR1, apresenta um baixo número de cópias e possui um promotor Ara induzível por arabinose, permitindo uma expressão rigorosa e controlada. As duas construções já existiam no laboratório, à data de início destes trabalhos.

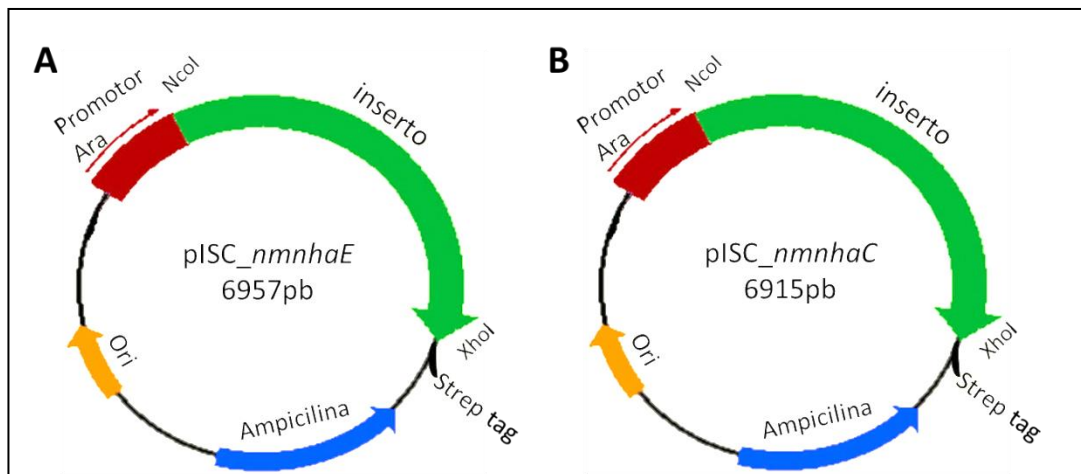


Figura 7. Representação do plasmídeo pISC-2 usado neste trabalho. **A-** pISC-2 com o *nmnhaE* inserido. **B-** pISC-2 com o *nmnhaC* inserido.

2.3. Introdução de mutações pontuais no gene *nmnhaE*

2.3.1. Seleção dos resíduos de aminoácidos

Selecionou-se os resíduos de aminoácidos com base na comparação de dois alinhamentos de sequências de aminoácidos. O primeiro alinhamento foi efetuado entre sequências pertencentes a antiporters Na^+/H^+ dos grupos NhaA, NhaB, NhaC, NhaD e NhaE, num total de 20 sequências (ver Anexo 1), quatro sequências analisadas e alinhadas por cada grupo, incluindo a sequência selvagem do NmNhaE. No segundo alinhamento, 50 sequências representativas do grupo NhaE foram alinhadas e comparadas (ver Anexo 2).

As sequências analisadas foram obtidas a partir da base de dados do *GenBank* e os respectivos alinhamentos foram construídos através do programa bioinformático Clustal W (versão 2.1). A análise topológica, com a finalidade de verificar a posição dos resíduos dentro ou fora dos TMS da proteína, foi obtida através do programa Topcons (Bernsel *et al.* 2009). Estas análises originaram a seleção de 10 resíduos de aminoácidos para a construção de mutantes pontuais.

2.3.2. Construção de mutantes pontuais do gene codificante do NmNhaE

A construção de mutantes pontuais do gene *nmnhaE* foi efetuada pelo método de mutagénesis dirigida com o kit comercial QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Figura 8), tendo-se procedido apenas a algumas alterações, referidas adiante.

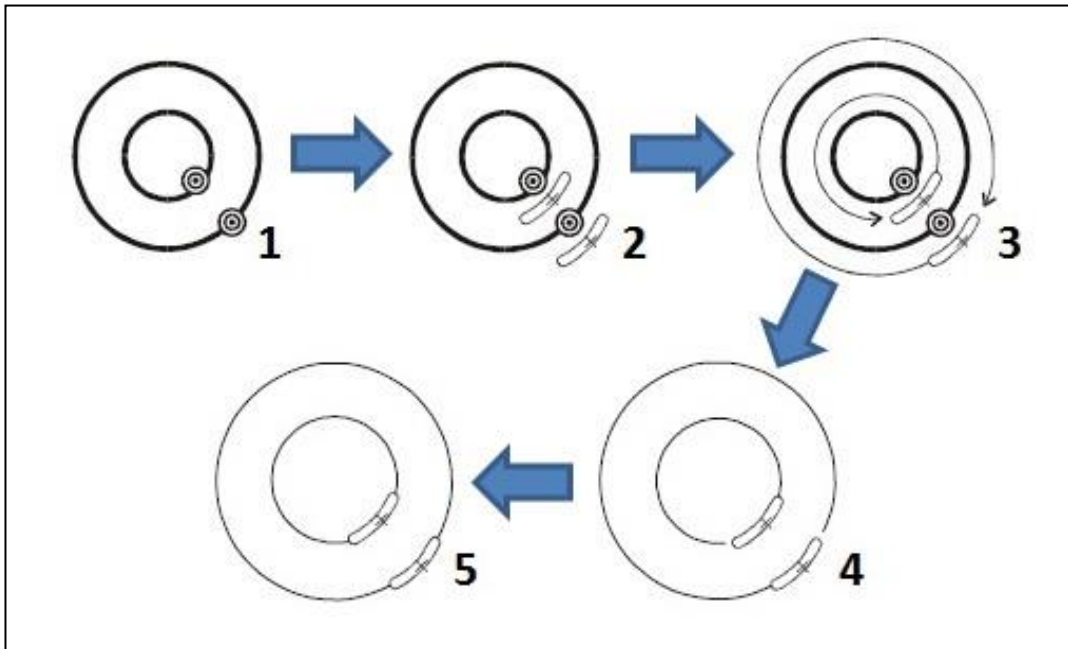


Figura 8. Método de mutagênese dirigida aplicado neste trabalho. 1- Gene no plasmídeo com o local (base) alvo de mutação(⊙). 2- Desnaturação do plasmídeo e emparelhamento dos primers mutagênicos (↔). 3- Extensão dos primers com a enzima *PfuUltra* DNA polimerase. 4- Digestão das cadeias de DNA parentais metiladas(—) com a enzima *Dpn* I. 5- Plasmídeo final (—) com a mutação desejada (×), que será transformado em XL1 blue competentes.

2.3.2.1. Desenho de primers e reação de PCR

Os primers para a mutagênese foram desenhados através do programa QuikChange Primer Design, disponível on-line em <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>, sintetizados e obtidos comercialmente (STABVIDA). A escolha dos primers mutagênicos (Tabela 3) ideais realizou-se segundo os seguintes critérios: tamanho, cerca de 30 pb; terminação nucleotídica nas bases G ou C; e o codão para a mutação de acordo com a frequência do mesmo em *E. coli*.

Tabela 3. Principais características dos primers selecionados e tipo de mutação que originam.

Mutação	Primers	Mudança de codão
E91Q	5'-gcactcgttgaac ag tacatcccttc-3'	GAA → CAG
H161L	5'-acccgccgctg ctg atcgtcatcttc-3'	CAC → CTG
G174S	5'-cctggttgcaaacat ct ctggcggctgacc-3'	GGC → TCT
D182N	5'-gaccccttggg ca acccccactcttc-3'	GAC → AAC
H201L	5'-gtggacggtcaaac ctg atgttcgccccg-3'	CAT → CTG
V258T	5'-cctgcttctggg ca ccgtcggcggcttc-3'	GTG → ACC
H272L	5'-tggaaacccgaac ctg ccgggattga-3'	CAC → CTG
H356L	5'-gtatcgtggt ctg gatacggcaggtc-3'	CAC → CTG
H361L	5'-cgatacggcaggt ctg ccgattaatgtg-3'	CAT → CTG
G413S	5'-ggcggttctatg ctt cggattcatgg-3'	GGT → TCT

O plasmídeo pISC-2 com o gene do NhaE inserido (pISC_*nmnhaE*) foi utilizado como molde para a mutagênese dirigida. Adicionou-se entre 40-50 ng de DNA, à mistura de PCR juntamente com os primers desenhados para cada reação, que decorreu de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Programa de PCR utilizado para a introdução de mutações pontuais no gene *nmnhaE*.

Etapas PCR	Programa PCR	
Desnaturação Inicial	95°C – 30 seg	1 Ciclo de Amplificação
Desnaturação	95°C – 30 seg	16 Ciclos de Amplificação
Ligação	55°C – 1 min	
Extensão	68°C – 7min	

2.3.2.2. Transformação em células competentes *E. coli* XL1blue

Após a reação de PCR, o produto foi digerido com a enzima de restrição *Dpn* I. Cerca de 10 µl do produto de PCR digerido, que contém os plasmídeos com as respectivas mutações, foram adicionados a 100 µl de células competentes *E. coli* XL1blue, incubados em gelo durante 30 minutos e submetidos a um choque térmico de 42°C, durante 45 segundos, seguido dum arrefecimento, em gelo, por mais 2 minutos. Após esta etapa, juntou-se 1 ml de meio LB líquido e incubou-se durante 1 hora, a 37°C, 150 rpm, para facilitar o crescimento. Por fim, plaquearam-se as células em meio LB sólido, que ficaram na estufa, durante a noite, a 37°C.

2.3.2.3. Extração e quantificação de DNA plasmídico

As colónias resultantes de cada mutante foram repicadas e crescidas durante a noite, em meio LB líquido, 37°C, 150 rpm. Os plasmídeos com as mutações foram extraídos da bactéria com o kit QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante, quantificados num espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC) e sequenciados para verificar potenciais erros, tendo sido posteriormente transformados e expressos em *E. coli* KNabc para testes de complementação e monitorização da atividade de antiporter Na⁺/H⁺.

2.4. Experiências de complementação

2.4.1. Preparação de células competentes - Estirpe *E. coli* KNabc

A estirpe *E. coli* KNabc tornou-se competente através do método químico com CaCl_2 . As células foram crescidas durante a noite, em meio LBK líquido com os antibióticos que selecionam a estirpe, kanamicina (ROTH) 50 $\mu\text{g/ml}$, cloranfenicol (ROTH) 20 $\mu\text{g/ml}$ e eritromicina (ROTH) 1 $\mu\text{g/ml}$, a 37°C, 150 rpm. No dia seguinte, inoculou-se o pré-inóculo em 100 ml de meio LBK líquido com os respectivos antibióticos, nas mesmas condições, e seguiu-se a OD_{600} até atingir 0.5. Nesta altura, as células foram colocadas em gelo, durante 20 minutos, e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 1089 x g, 4°C (*Beckman Coulter AvantiTM*, rotor JA-25.50). O pellet foi suspenso em 10 ml de CaCl_2 0,1M (MERCK), e colocou-se em gelo por 20 minutos, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições referidas anteriormente. De seguida, ressuspendeu-se o pellet em 4 ml de CaCl_2 0.1M, e repetiu-se o passo anterior de centrifugação. Por último, o pellet foi novamente ressuspendido em 0.5 ml de CaCl_2 0.1 M e em 15% de glicerol, e dividido em alíquotas que foram congeladas em azoto líquido e conservadas a -80 °C para uso posterior.

2.4.2. Transformação em células competentes - Estirpe *E. coli* KNabc

As células *E. coli* KNabc, previamente competentes, foram transformadas com o plasmídeo pISC-2 possuindo vários insertos distintos: o *nmnhaC*, o *nmnhaE* selvagem, o gene *nhaE* com as respetivas mutações, e ainda apenas o plasmídeo pISC-2 sem inserto (controlo negativo e positivo quando crescido e induzido em meio LB ou meio LBK, respetivamente). O processo de transformação foi efetuado de igual forma para todas as variações do plasmídeo:

Cerca de 90 ng de plasmídeo foram adicionadas a 100 μl de células competentes de *E. coli* KNabc e incubadas em gelo durante 30 minutos. De seguida, esta suspensão foi submetida a um choque térmico (incubação a 42°C - 30 segundos, seguida de arrefecimento rápido em gelo por mais 2 minutos). Após esta etapa, adicionou-se 1 ml de meio LBK líquido à suspensão de células já transformadas. Por fim, plaquearam-se

as células em meio LBK sólido, que ficaram durante a noite a 37°C, para permitir a formação de colónias.

2.4.3. Expressão e crescimento dos transformantes

As células *E. coli* KNabc, transformadas com os plasmídeos (secção 2.4.2) foram crescidas durante a noite, em meio LBK líquido com ampicilina, a 37°C, 150 rpm. Procedeu-se a inoculações em novo meio LBK líquido, com o mesmo antibiótico, que foram incubadas a 37°C, 150 rpm até atingirem uma OD₆₀₀ de 0.7, monitorizando-se o crescimento celular num espectrofotómetro MULTISKAN GO (Thermo SCIENTIFIC). De seguida, adicionou-se arabinose (Sigma) 15 mM ao meio, de forma a induzir a expressão da proteína recombinante, continuando a indução durante a noite, nas mesmas condições. Foram efectuadas posteriormente complementações em meio sólido e meio líquido. Para as complementações em meio sólido, 50 µl das culturas induzidas de *E. coli* KNabc contendo o gene que codifica o NhaE, *E. coli* KNabc contendo o plasmídeo pISC-2 foram depositadas em placas com meio LBK sólido com ampicilina e 15 mM de arabinose a diferentes pHs, 6.5, 7 e 8 e com diferentes concentrações de NaCl e LiCl. Procedeu-se do mesmo modo para *E. coli* K-12, mas sem a adição de antibióticos e arabinose. Adicionaram-se às placas 1.0 M de NaCl para todos os pHs e também 1.5 M a pH 7. A concentração adicionada de LiCl foi de 0.4 M para todos os pHs testados. Para verificar a resistência em meio líquido, as culturas induzidas foram inoculadas em novo meio LBK líquido com ampicilina e 15 mM de arabinose, onde o KCl foi substituído pelas concentrações desejadas de NaCl (Panreac), 0.7 M e 1.0 M, ajustadas a pH 6.5, 7 e 8, e também 340 mM de NaCl e 200 mM de LiCl a pH 7 onde *E. coli* K-12 foi utilizada como controlo positivo. As curvas de crescimento foram monitorizadas à OD de 600 nm. Para cada experiência, foram realizadas pelo menos duas réplicas biológicas.

2.5. Estudo da atividade de antiporter Na^+/H^+

2.5.1. Preparação de vesículas invertidas

Na preparação de vesículas invertidas, a expressão da proteína foi efetuada como descrito anteriormente (secção 2.4.3.), com uma alteração: a indução com arabinose decorreu a 20°C, 120 rpm, durante aproximadamente 20 horas. Posteriormente, seguiu-se um protocolo adaptado de Rosen, 1986. Brevemente, as células foram recolhidas numa centrífuga *Beckman Coulter AvantiTM*, rotor JA-10, a 10000 x g, durante 10 minutos, seguindo-se de duas lavagens sucessivas com Tampão B (10 mM Tris-HCl pH 7.5 (ROTH), 140 mM cloreto de colina (Sigma), 250 mM sacarose (Sigma) e 0.5 mM DTT (Sigma), sendo ressuspendidas no mesmo tampão. Após a adição de 5 mM de MgCl_2 (Riedel-deHaën) e uma quantidade mínima de DNase (Roche) ($\approx 5 \mu\text{g/ml}$), as células foram partidas uma vez numa *french press* (*Thermo Electron Corporation FA-032 40k - Standard Cell*) a uma pressão interna de 12000 psi. Centrifugaram-se (centrífuga *Beckman Coulter AvantiTM*, rotor JA-25.50), as células, a 8000 x g durante 10 minutos, transferindo-se o sobrenadante para novos tubos de centrifuga, procedendo-se a uma nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante da última centrifugação foi ultracentrifugado a 148167 x g (*Beckman Coulter OptimaTM*, 45-Ti) durante 1 hora. O *pellet* formado, foi ressuscitado em Tampão B, e novamente ultracentrifugado, nas mesmas condições, por mais 1 hora, de forma a depositar a maior quantidade de vesículas possível. Por fim, as vesículas foram suspensas em Tampão B, alíquotadas, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C para utilização nos ensaios de atividade.

2.5.2. Determinação da quantidade de proteína

De modo a medir a quantidade de proteína nas vesículas invertidas, usou-se o método do BCA, através do *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo SCIENTIFIC), de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio realizou-se numa placa de 96 poços contendo as vesículas invertidas anteriormente preparadas (secção 2.5.1.) e diferentes concentrações de albumina de soro bovino (2 mg/ml, 1.6 mg/ml, 1.2 mg/ml, 0.8 mg/ml,

0.6 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml e 0 mg/ml) utilizada como padrão para a construção da curva de calibração. A absorvância foi medida a 562 nm num espectrofotômetro MULTISKAN GO (Thermo SCIENTIFIC). A curva de calibração gera uma equação polinomial de segundo grau, através da qual é possível calcular as concentrações de proteína para as absorvâncias medidas.

2.5.3. Determinação da atividade de antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$

A atividade de antiporter Na^+/H^+ do NmNhaE selvagem, dos seus mutantes e do NmNhaC foi estimada em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc, onde a expressão dos transportadores foi previamente induzida conforme anteriormente descrito (secção 2.5.1.). Aproximadamente 20 μg de vesículas foram adicionadas numa mistura de reação contendo, 140 mM de KCl, 5 mM de MgCl_2 , 50 mM de tampão Hepes (sigma), ajustado a diferentes valores de pH, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 e 9 com KOH, e 0.5 μM de laranja de acridina (sigma). A adição de 10 mM de lactato de potássio (sigma), oxidado pela lactato desidrogenase, presente na membrana citoplasmática da bactéria, gerou um gradiente de pH que provocou o *quenching* da fluorescência, devido à internalização de H^+ , monitorizável pelo laranja de acridina, que passa para o interior da membrana por difusão, originando o declínio da fluorescência. O *quenching* atinge posteriormente um estado mais estável ao qual é possível adicionar o íon em estudo. A atividade de antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ resultante da adição de NaCl (ROTH) ou LiCl (sigma) à concentração desejada, desfaz até certo ponto o gradiente de pH gerado, permitindo o efluxo do laranja de acridina, que provoca o *dequenching* da fluorescência, atingindo-se posteriormente um novo estado mais estável. A razão entre o *dequenching* e o *quenching* do laranja de acridina provocado pela adição de lactato consiste na determinação da atividade de antiporter. A adição de 0.02 mM de CCCP restabelece o gradiente de pH para valores iniciais. A variação da fluorescência foi monitorizada num espectrofluorímetro (*Cary Varion Eclipse*) ao comprimento de onda de excitação de 492 nm e ao comprimento de onda de emissão de 528 nm. Para elaborar as cinéticas do NmNhaE selvagem e respetivos mutantes, foram adicionadas várias concentrações dos íões NaCl e LiCl (0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.7 mM, 1mM, 1.5 mM, 2.5 mM, 4 mM e

6 mM). Foram efetuadas duas réplicas biológicas de cada mutante e pelo menos três replicados técnicos para cada concentração de íão. Os valores obtidos foram utilizados para produzir gráficos de Lineweaver-Burk (Lineweaver & Burk, 1934), de onde podem ser calculados os respectivos parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} . Para elaborar os perfis de pH do NmNhaE, 4 mM dos íões em estudo foram adicionados a mistura de reação com valores de pH 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 e 9. Foram efetuados pelo menos três replicados técnicos para cada pH.

RESULTADOS

Em 2006, Melo e colaboradores descobriram um novo grupo de Nhas, o NhaE, ao estudarem o RmNhaE, a partir da comparação de seqüências de aminoácidos de antiporters Na^+/H^+ de grupos conhecidos (NhaA, NhaB, NhaC e NhaD) (Melo *et al.* 2006). No mesmo estudo, foi também efetuada uma pesquisa no genoma de *N. meningitidis* por antiporters Na^+/H^+ , tendo-se identificado duas ORFs com similaridade aos antiporters RmNhaE e NhaC de *Bacillus subtilis*, as ORFs NMB0570 (*nmnhaE*) e NMB0536 (*nmnhaC*), respectivamente. A comparação das seqüências de aminoácidos destes hipotéticos antiporters Na^+/H^+ de *N. meningitidis* com vários grupos de Nhas, confirmaram a similaridade com os antiporters Na^+/H^+ dos grupos E e C (Figura 9).

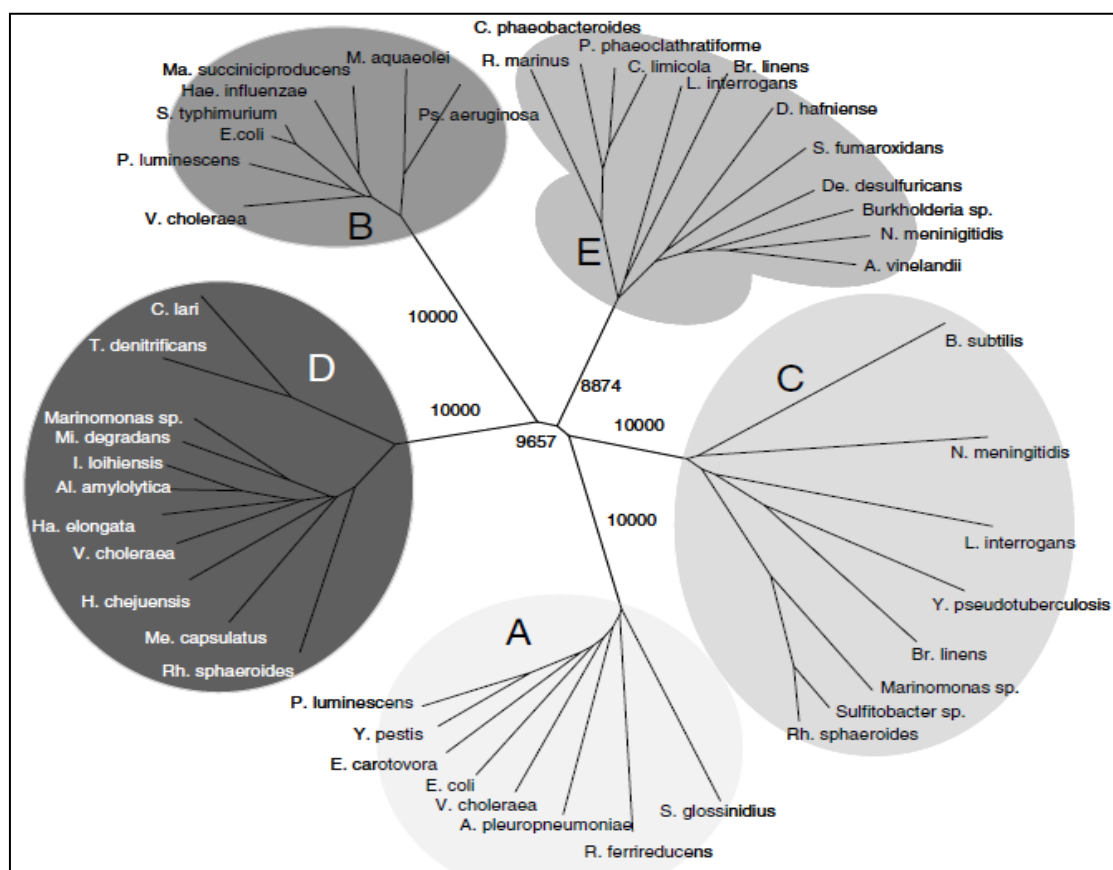


Figura 9. Representação ilustrativa da relação entre vários antiporters do tipo Nha distribuídos em diferentes grupos. As ORFs NMB0536 e NMB0570 que codificam os antiporters Na^+/H^+ de *N. meningitidis*, estão diferentemente agrupados, NhaC e NhaE respectivamente. Esta imagem foi retirada da Figura 4 de Melo *et al.* 2006.

Decidiu-se estudar as duas ORFs, NMB0570 e NMB0536, para confirmar que codificam proteínas com atividade de antiporter Na^+/H^+ , através de uma abordagem de expressão e caracterização funcional. O melhor conhecimento destes dois antiporters

Na^+/H^+ vai permitir perceber o seu papel em *N. meningitidis*, bem como a médio prazo poderá contribuir para o entendimento da relação entre as proteínas transportadoras de Na^+ e a patogenicidade da bactéria.

Durante este trabalho, os dois genes, entretanto clonados em plasmídeos pISC-2, foram transformados numa estirpe de *E. coli* deficiente em antiporters Na^+/H^+ , e por isso, incapaz de resistir a concentrações maiores que 200 mM de NaCl e 10 mM de LiCl, a estirpe *E. coli* KNabc (Nozaki *et al.* 1996). Desta forma, pretendeu-se verificar se a expressão de cada um dos antiporters Na^+/H^+ de *N. meningitidis*, em *E. coli* KNabc, permite que esta estirpe, resista quando exposta a concentrações de Na^+ e Li^+ superiores ao seu limite de resistência, verificando-se também a variação do crescimento em função do pH do meio de cultura. Entretanto, efetuou-se uma abordagem a nível molecular do transporte de iões, Na^+ e Li^+ , com a caracterização da atividade de $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc, com os antiporters Na^+/H^+ previamente expressos. A atividade de antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ do NmNhaE, permitiu calcular os parâmetros cinéticos, K_m e V_{\max} , bem como verificar a influência do pH na atividade dos dois iões, Na^+ e Li^+ . A caracterização do NmNhaE foi realizada em colaboração com o Pedro Sousa (Sousa *et al.* 2013), sendo importante realçar que, apenas nesta etapa houve colaboração de outro investigador. Além disso, foram também ao longo deste trabalho construídos 10 mutantes pontuais do gene que codifica o NmNhaE, inserido no plasmídeo pISC-2. Estas mutações foram efetuadas em resíduos de aminoácidos selecionados por se julgar serem importantes na função do transportador, ou a nível do mecanismo de transporte de Na^+ ou Li^+ através da membrana, ou ainda a nível da sua resposta à variação do pH. Os testes realizados nestes mutantes pontuais foram semelhantes aos usados para testar a funcionalidade do NhaE selvagem. Os plasmídeos que possuem os mutantes do NhaE foram transformados em *E. coli* KNabc, tendo-se testado a sua resistência ao NaCl a diferentes valores de pH. Foram igualmente determinadas as suas atividades de antiporter Na^+/H^+ calculando os parâmetros cinéticos, K_m e V_{\max} , assim como a amplitude da atividade de antiporter Na^+/H^+ de cada resíduo de amino ácido a diferentes valores de pH. Esta experiência foi realizada em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde foi induzida a expressão de cada mutante.

3.1. Caracterização dos antiporters Na⁺/H⁺ de *N. meningitidis*

3.1.1. Antiporter NhaC de *N. meningitidis*

3.1.1.1. Resistência ao Na⁺ de *E. coli* KNabc onde foi induzida a expressão do NmNhaC

Para a caracterização do antiporter NhaC de *N. meningitidis*, *E. coli* KNabc foi transformada com o plasmídeo pISC-2 onde a ORF NMB0536, codificante do NhaC de *N. meningitidis*, foi inserida (*E. coli* KNabc_pISCnhaC). *E. coli* KNabc foi também transformada com o pISC-2 (*E. coli* KNabc_pISC) e usada como controlo negativo, quando sujeito a 340 mM de NaCl, e como controlo positivo quando crescida em LBK. Os transformantes foram crescidos em meio LBK líquido com 340 mM de NaCl aos valores de pH 6.5, 7 e 8, tendo sido previamente expressos.

Observou-se que este antiporter é capaz de complementar a estirpe *E. coli* KNabc em 340 mM de NaCl para todos os pH testados (Figura 10). *E. coli* KNabc onde a expressão do NmNhaC foi induzida, cresce melhor em meio LBK líquido a pH 7 (Figura 10), observando-se que o crescimento é retardado a pH 8 (Figura 10). Pode constatar-se também que, apesar de haver um menor crescimento a pH 8, este é duas vezes superior em relação ao controlo positivo, *E. coli* KNabc_pISC em LBK.

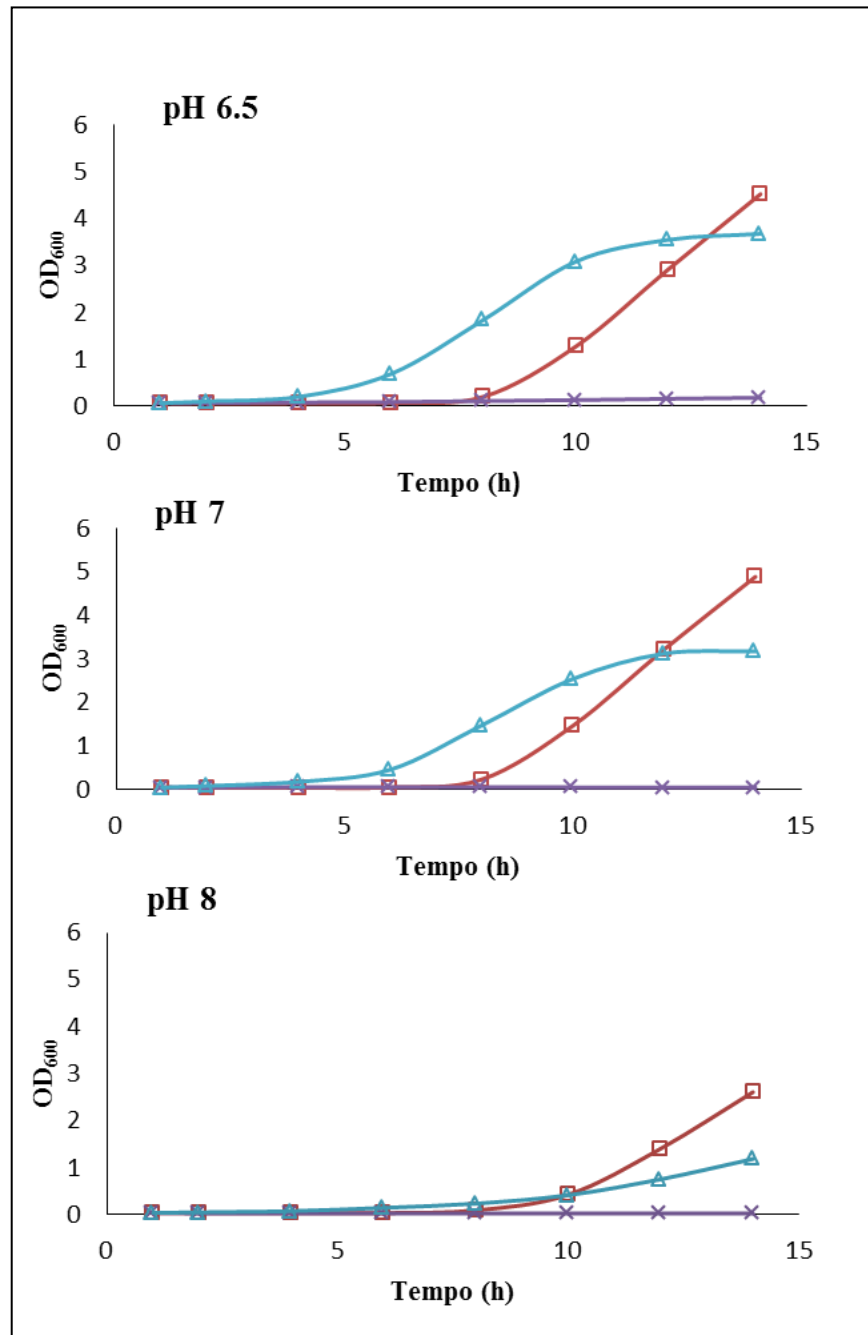


Figura 10. Representação gráfica da resistência de *E. coli* KNabc ao Na⁺ em meio LBK com NaCl, onde a expressão do NmNhaC foi induzida. *E. coli* KNabc onde o NmNhaC foi expresso é capaz de resistir em NaCl 340 mM aos valores de pH 6.5 7 e 8. *E. coli* KNabc_pISCNhaC (—■—); Controlo negativo, *E. coli* KNabc_pISC em meio LB340 mM (—×—); Controlo positivo, *E. coli* KNabc_pISC em meio LBK (—△—).

3.1.1.2. Atividade de Na^+/H^+

A atividade de antiporter Na^+/H^+ do NmNhaC, foi testada em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde o antiporter NhaC foi previamente expresso. Inicialmente, efetuou-se um ensaio controlo, apenas com a adição de 10 mM de lactato de K^+ e CCCP, para verificar que o *quenching* gerado pelo lactato era estável durante o tempo necessário para o ensaio, de modo a não influenciar o *dequenching* desencadeado pela adição do Na^+ (Figura 11.A).

Verificou-se que a adição de 10 mM de lactato originou o *quenching* da fluorescência, como explicado anteriormente (secção 2.5.3), mas após a adição de NaCl não se observou qualquer *dequenching*, resultante da atividade de antiporter Na^+/H^+ , a pH 7 e 7.5 (Figura 11.B).

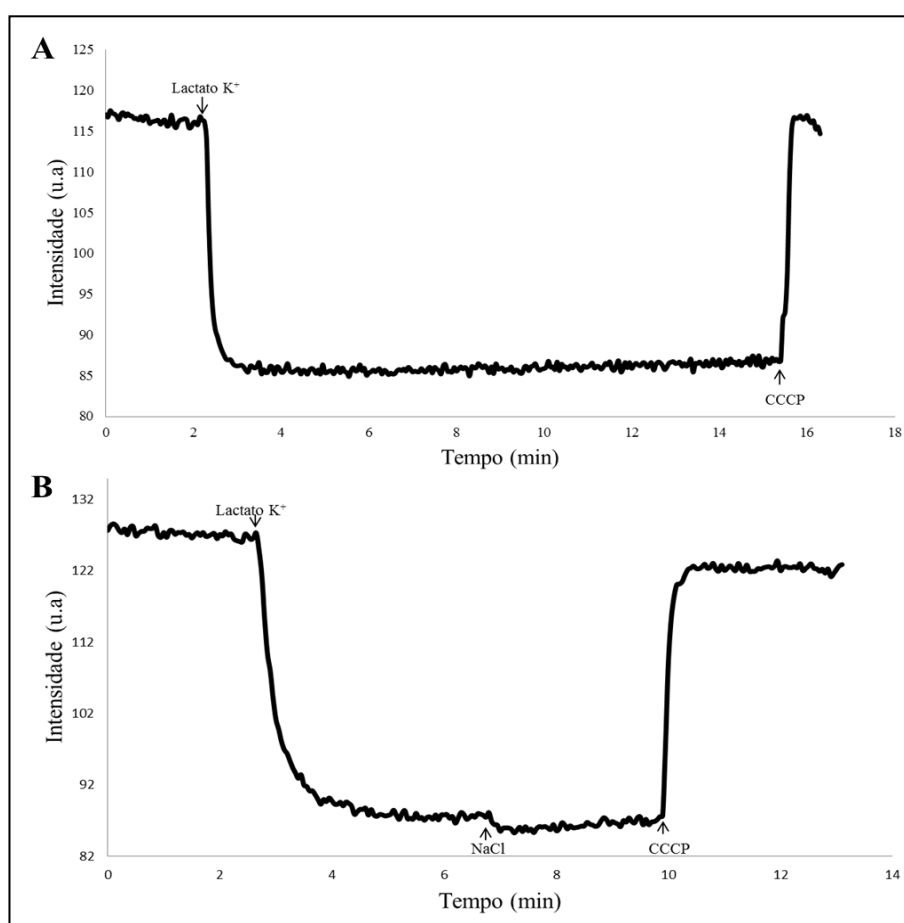


Figura 11. Ensaio da atividade de transporte de Na^+ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão do NmNhaC foi induzida. Não se verificou atividade de Na^+/H^+ em vesículas de *E. coli* KNabc onde o NmNhaC foi expresso a pH 7. A adição de lactato de K^+ originou o *quenching* da fluorescência e o CCCP originou o *dequenching* da fluorescência previsto. As setas indicam a altura em que os reagentes são adicionados à mistura de reação, como descrito na secção 2.5.3. **A**- Ensaio controlo, com adição de lactato de K^+ e CCCP. **B** – Ensaio com a adição de NaCl, mas sem resposta de antiporter Na^+/H^+ visível. O mesmo sucedeu a pH 7.5.

3.1.2. Antiporter NhaE de *N. meningitidis*

3.1.2.1. Resistência ao Na⁺ e Li⁺ de *E. coli* KNabc onde foi induzida a expressão do NmNhaE

Para a caracterização do NmNhaE, *E. coli* KNabc foi transformada com o plasmídeo pISC-2 onde a ORF NMB0570, codificante do NhaE de *N. meningitidis*, foi inserida (*E. coli* KNabc_pISCnhaE). O pISC-2, sem inserto, foi transformado em *E. coli* KNabc e utilizado como controlo negativo quando exposto a NaCl ou LiCl, ou como controlo positivo quando *E. coli* KNabc_pISC foi crescida em meio LBK. A estirpe *E. coli* K-12 foi também usada como controlo positivo. Anteriormente ao teste à resistência ao NaCl e LiCl, a expressão dos transformantes foi induzida com 15 mM de arabinose. Testou-se inicialmente a complementação de *E. coli* KNabc_pISCnhaE, *E. coli* KNabc_pISC e *E. coli* K-12 monitorizando o crescimento em meio LBK líquido, contendo NaCl 340 mM (Figura 12.A) e LiCl 200 mM (Figura 12.B), durante aproximadamente 12 horas. Com o intuito de verificar se *E. coli* KNabc_pISCnhaE conseguia resistir a concentrações mais elevadas de NaCl e LiCl em diferentes pH, foram efetuadas experiências em meio sólido, a pH 6.5, 7 e 8, com NaCl 1.0 M, e 1.5 M para pH 7, e LiCl 0.4 M. Posteriormente, a variação do crescimento em função do pH do meio, foi observada em meio líquido a pH 6.5, 7 e 8 em NaCl 0.7 M e 1.0 M, monitorizando as curvas de crescimento durante aproximadamente 12 horas.

Constatou-se que o NmNhaE consegue conferir resistência ao Na⁺ e ao Li⁺ a uma estirpe de *E. coli* em que os antiporters NhaA, NhaB e ChaA foram deletados (Figura 12 e 13), entre pH 6.5 e 8 (Figura 13). Observou-se que o crescimento atinge uma OD₆₀₀ final mais elevada a uma maior concentração de NaCl, do que a uma menor concentração de LiCl (Figura 12). A concentração de NaCl de 0.7 M, o crescimento da bactéria varia consoante o pH, sendo o seu máximo atingido a pH 7 (Figura 13.A). A uma concentração de NaCl de 1.0 M observou-se que o crescimento é duas vezes inferior do que a 0.7 M, e contrariamente, não se verificou diferenças na taxa e amplitude dos crescimentos a diferentes valores de pH (Figura 13.B). É importante referir que, a sobrevivência chega a ser visível em concentrações muito elevadas, como em NaCl 1.5 M, concentração à qual *E. coli* K-12 não sobrevive (Tabela 5).

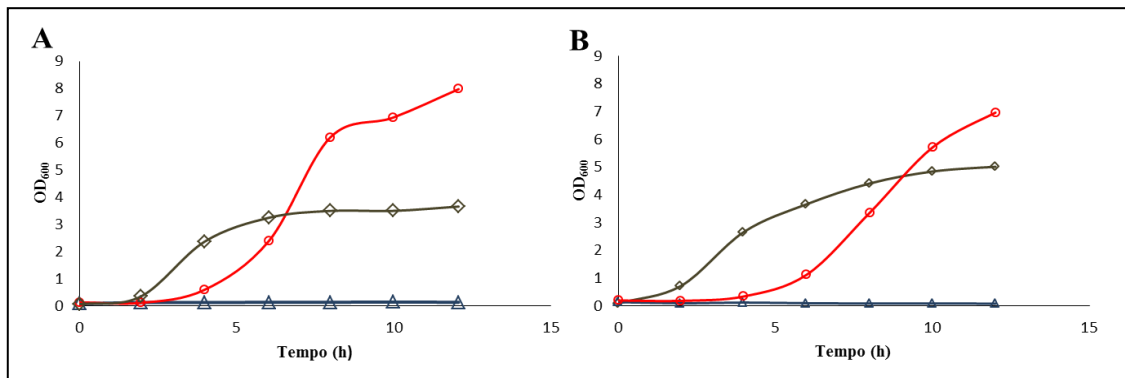


Figura 12. Representação gráfica da resistência de *E.coli* KNabc ao Na⁺ em meio líquido, a pH 7, com NaCl e LiCl, onde a expressão do NmNhaE foi induzida. **A-** NaCl 340 mM ; **B-** LiCl 200 mM. *E.coli* KNabc_pISCnhaE (—○—); Controlo negativo, *E.coli* KNabc_pISC (—△—); Controlo positivo, *E.coli* K-12 (—◇—).

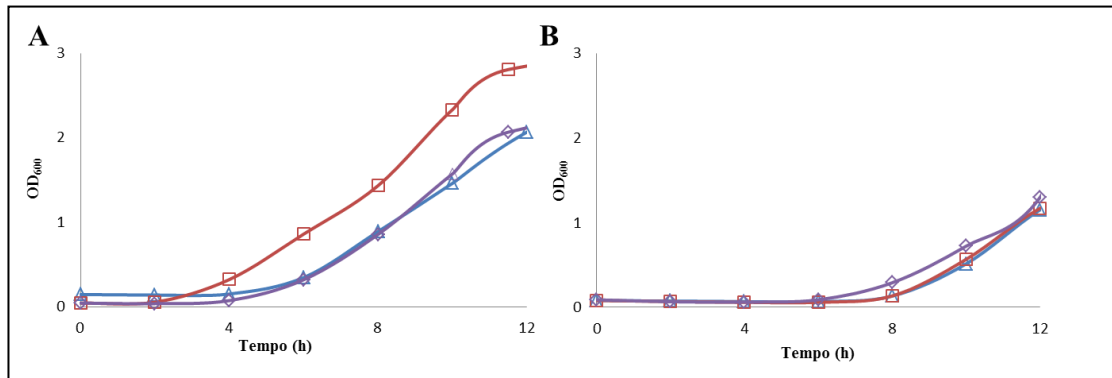


Figura 13. Representação gráfica da resistência de *E.coli* KNabc ao Na⁺, em meio líquido, com elevadas concentrações de NaCl, a diferentes valores de pH, onde a expressão do NmNhaE foi induzida. **A-** NaCl 0.7 M; **B-** NaCl 1.0 M. *E.coli* KNabc_pISCnhaE pH 6.5 (—△—); *E.coli* KNabc_pISCnhaE pH 7 (—□—); *E.coli* KNabc_pISCnhaE pH 8 (—◇—).

Tabela 5. Resistência ao Na⁺ e Li⁺ de *E. coli* KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida, em meio sólido a valores de pH 6.5, 7 e 8.

	pH 6.5	pH 7		pH 8
NaCl (M)	1.0	1.0	1.5	1.0
KNabc_pISC	-	-	-	-
KNabc_pISCnhaE	+	++	++	++
<i>E. coli</i> K-12	+	++	-	-
LiCl (M)	0.4	0.4		0.4
KNabc_pISC	-	-		-
KNabc_pISCnhaE	++	++		++
<i>E. coli</i> K-12	++	++		-

+ cresceu pouco; ++ cresceu muito; - não cresceu

3.1.2.2. Caracterização cinética do transporte de íons Na⁺ e Li⁺

A atividade de antiporter Na⁺/H⁺ e Li⁺/H⁺ do NmNhaE, foi medida em vesículas invertidas preparadas de *E. coli* KNabc_pISCnhaE. Através desta técnica, foi-nos possível observar a atividade de antiporter Na⁺/H⁺ deste transportador, seguindo o *dequenching* da fluorescência do laranja de acridina após a adição dos cátions Na⁺ e Li⁺, a diferentes concentrações (Figura 14.A) (0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.7 mM, 1mM, 1.5 mM, 2.5 mM, 4 mM e 6 mM). Os parâmetros cinéticos do antiporter, obtidos a pH 7 e 7.5, foram extrapolados através de um gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 14.B), construído a partir da linearização do gráfico de Michaelis-Menten.

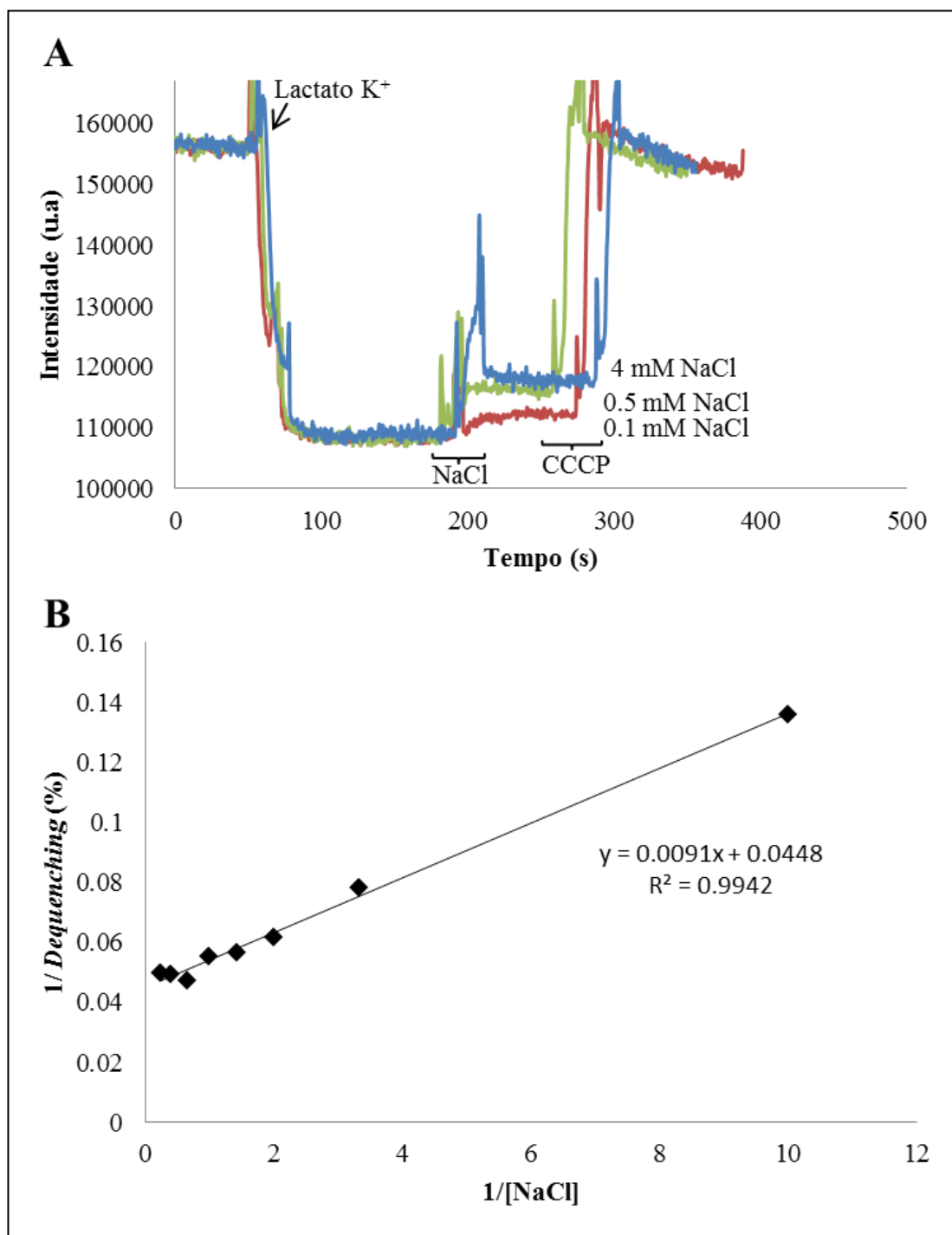


Figura 14. Caracterização cinética do NmNhaE. **A-** Ensaio de transporte de *E.coli* KNabc onde a expressão do NmNhaE foi previamente induzida, realizado a pH 7. A atividade de antiporter Na⁺/H⁺ aumenta como aumento da concentração de NaCl, adicionada até uma concentração saturante do íon. O mesmo sucede para o LiCl e para pH 7.5. A adição dos reagentes está indicada na figura. Adição de 0.1 mM de NaCl (—); 0.5 mM de NaCl (—); 4 mM de NaCl (—). **B-** Gráfico a partir do qual foram extrapolados os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m , para o Na⁺ do NmNhaE a pH 7.

Verificou-se que o NmNhaE possui um K_m para o Na^+ de 0.24 ± 0.07 mM, a pH 7 e de 0.14 ± 0.04 , a pH 7.5, e um V_{\max} de 32 ± 10 %DQ e de 16 ± 3 %DQ, a pH 7 e 7.5, respetivamente. O K_m para a ligação do ião Li^+ é de 0.62 ± 0.07 mM, a pH 7 e de 0.45 ± 0.13 mM, a pH 7.5, e o V_{\max} é de 19 ± 1 %DQ e 11 ± 1 %DQ, para pH 7 e pH 7.5, respetivamente (Tabela 6) (Sousa *et al.* 2013).

Tabela 6. Parâmetros cinéticos do NmNhaE em *E. coli* KNabc, onde a expressão do NhaE foi previamente induzida. (Adaptado de Sousa *et al.* 2013)

		NaCl	LiCl
pH 7	K_m (mM)	0.24 ± 0.07	0.62 ± 0.07
	V_{\max} (%DQ)	32 ± 10	19 ± 1
pH 7.5	K_m (mM)	0.14 ± 0.04	0.45 ± 0.13
	V_{\max} (%DQ)	16 ± 3	11 ± 1

3.1.2.3. Variação da atividade de antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ em função do pH

A atividade de antiporter Na^+/H^+ foi medida em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão do NmNhaE foi previamente induzida, a diferentes valores de pH, após a adição de 4 mM de NaCl e LiCl (Figura 15). Observou-se que o NmNhaE tem um perfil de atividade idêntico para ambos os iões. A atividade de antiporter foi observada de pH 6.5 a 9. Verificou-se ainda que a pH 7 a atividade é maior, sendo esta a atividade ótima de translocação dos iões Na^+ e Li^+ . A pH 6.5, a atividade é inferior aos restantes valores de pH, sendo que a partir de pH 7 a atividade diminui até pH 8.5, subindo novamente a pH 9 (Figura 16).

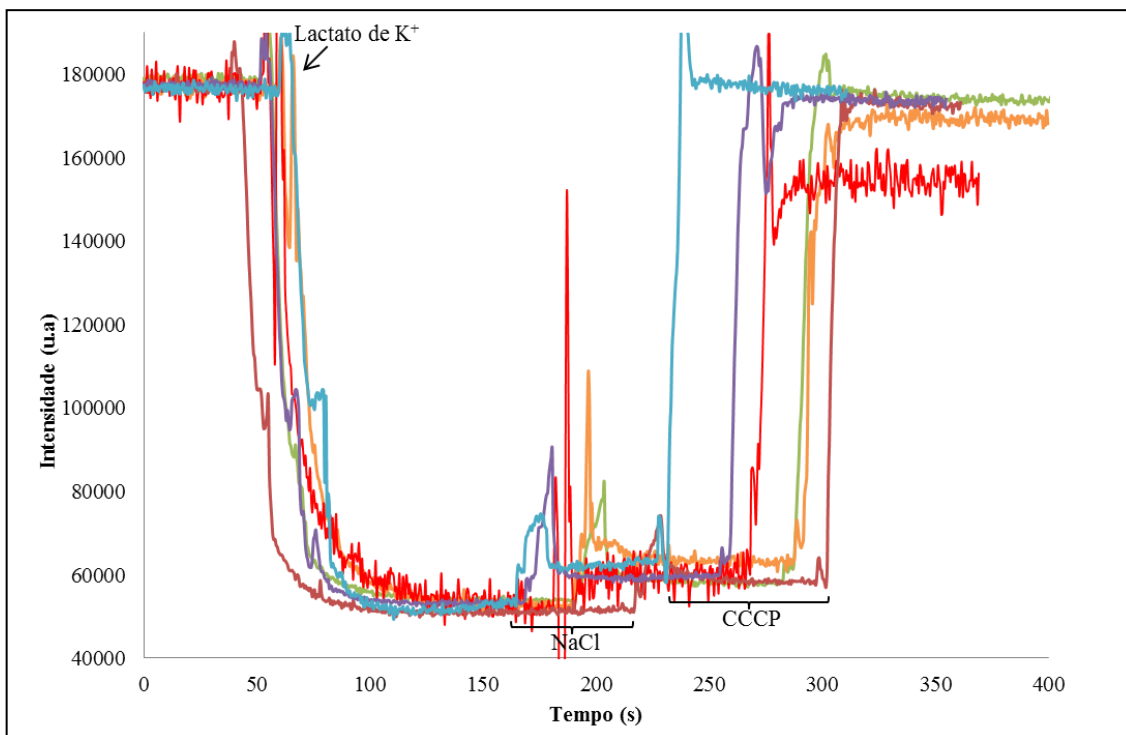


Figura 15. Representação gráfica da variação da atividade de antiporter Na^+/H^+ do NmNhaE de acordo com o pH e com a adição de 4 mM de NaCl em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida. Observa-se que as maiores atividades de antiporter Na^+/H^+ pertencem aos valores de pH 7 e 9. A adição dos reagentes está indicada na figura. pH 6.5 (—); pH 7 (—); pH 7.5 (—); pH 8 (—); pH 8.5 (—); pH 9 (—). Para o íon LiCl adicionou-se a mesma concentração de 4 mM, tendo-se observado um resultado semelhante, não representado nesta figura.

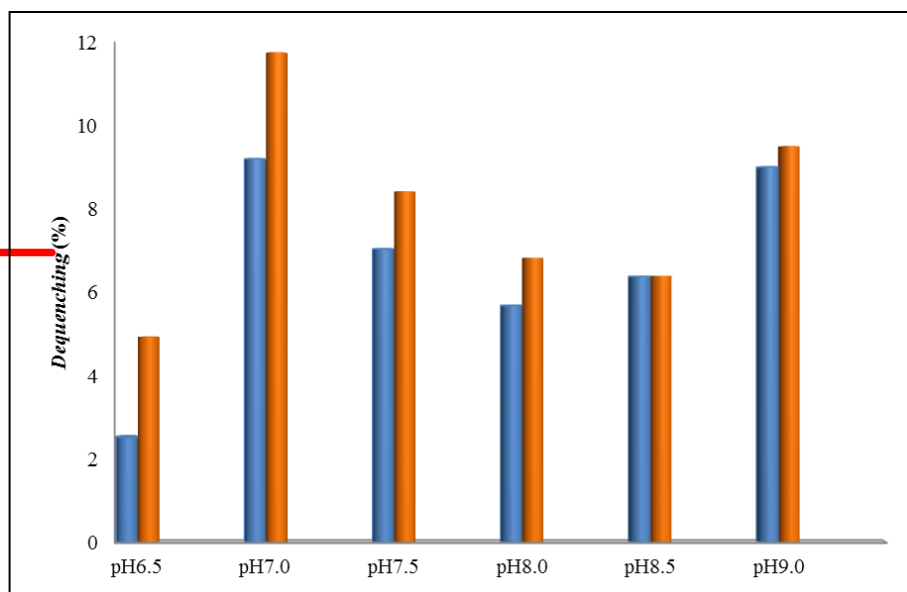


Figura 16. Representação gráfica da variação da atividade de antiporter Na^+/H^+ do NmNhaE de acordo com o pH. Variação da atividade com adição de 4 mM de LiCl (■). Variação da atividade com adição de 4 mM de NaCl (■). (Adaptado de Sousa *et al.* 2013)

3.1.3. Introdução de mutações pontuais no gene *nhaE* codificante do NmNhaE

Procedeu-se ao estudo da importância funcional e estrutural de resíduos selecionados do NmNhaE, através da introdução de mutações pontuais na sua sequência codificante, por mutagenese dirigida. Foram selecionados 10 resíduos de aminoácidos, após a comparação de alinhamentos entre sequências de aminoácidos do NmNhaE com outros antiporters deste, e de outros grupos, considerando também trabalhos anteriores que associam resíduos específicos à estrutura, atividade ou resposta ao pH em antiporters Nha de outros organismos.

3.1.3.1. Seleção de resíduos de aminoácidos

Foram realizadas duas comparações de sequências de aminoácidos: i) A sequência de aminoácidos do NmNhaE foi comparada com as sequências de aminoácidos de alguns antiporters pertencentes aos tipos NhaA, NhaB, NhaC, NhaD e NhaE (ver Anexo 1), onde estudos deste tipo já foram realizados. ii) Comparou-se as sequências de aminoácidos de 50 proteínas com elevada similaridade com o NmNhaE e por isso considerados hipotéticos antiporters NhaE (ver Anexo 2). Da análise destes dois alinhamentos foram selecionados 10 resíduos de aminoácidos para mutagenese dirigida, de forma a estudar o seu envolvimento na estrutura e funcionamento da proteína. O primeiro alinhamento identificou o G174 e o V258 (Figura 17), o primeiro conservado em 19 das 20 sequências analisadas (95,0%), e na posição do segundo, observa-se sempre a presença de um resíduo hidrofóbico em todas as sequências analisadas (20 sequências, 100%) (Ver Anexo 1). Uma vez que são resíduos conservados em antiporters de grupos diferentes, é possível supor que estes resíduos estarão envolvidos no mecanismo do transporte de Na⁺. Entre antiporters do tipo NhaE, pode-se observar a conservação de alguns resíduos ácidos, dos quais foram escolhidos o E91 e o D182 (Figura 18), que por terem carga negativa poderão estar envolvidos no mecanismo de translocação do íon Na⁺. O resíduo E91 encontra-se conservado em 42 das 50 sequências do alinhamento (84,0%), sendo necessário evidenciar que nas

restantes sequências (8/50, 16,0%), na mesma posição, foi identificado igualmente um resíduo ácido, o aspartato (ver Anexo 2). Já o resíduo D182 encontra-se conservado em todas as sequências (100%) (ver Anexo 2). Além disso, estes dois resíduos de aminoácidos são também conservados no VcNhaD, E100 e D199, respectivamente. Neste antiporter de *V. cholerae* a mutação E100A originou uma proteína com menor atividade de antiporter Na^+/H^+ e um perfil de pH alterado para shift alcalino, enquanto D199A provocou a inativação do antiporter para o Na^+ e para o Li^+ . Foi também escolhido outro resíduo de glicina, G413 (Figura 18), por se pensar estar envolvido na translocação do Na^+ . G413 é conservado em 43 das 50 sequências analisadas entre NhaEs (ver Anexo 2), e também conservado em *E. coli* (G338), onde se verificou que a mutação para serina provocou um *shift* no perfil de pH, para um valor de pH mais ácido (Rimon *et al.* 1998), e *H. pylori* (G385), onde o mesmo tipo de mutação originou uma proteína sem atividade (Tsuboi *et al.* 2003). Por fim, para identificar resíduos que pudessem estar envolvidos na resposta ao pH, optou-se por escolher resíduos que estivessem próximo de um pK_a fisiológico (Padan *et al.* 2004; Habibian *et al.* 2005). Além disso, em *E. coli* um resíduo de histidina, H225, foi extensivamente associado à resposta ao pH, capaz de alterar o perfil de pH do EcNhaA para pH ácido, quando mutado para arginina (Gerchman *et al.* 1993; Padan *et al.* 2004). Posteriormente, outros resíduos de histidina foram também associados à dependência do pH noutros organismos, como H233 no HpNhaA (Tsuboi *et al.* 2003) e H93 e H210 no VcNhaD (Habibian *et al.* 2005) e mais recentemente as H87 e H88 foram também estudadas no NhaH de *H. dabanensis* (HdNhaH), tendo-se verificado que causavam um *shift* ácido no perfil de pH (Jiang *et al.* 2013). Por isso, da mesma comparação de sequências, foram também selecionados cinco resíduos de histidina com o intuito de compreender se existe alguma relação entre estes resíduos e a sua resposta ao pH. Os resíduos escolhidos foram H161, H201, H272, H356, H361 (Figura 18), conservados em 35 (70,0%), 32 (64,0%), 2 (4,0%), 9 (18,0) e 1 (2,0%) das 50 sequências, respectivamente (ver Anexo 2).

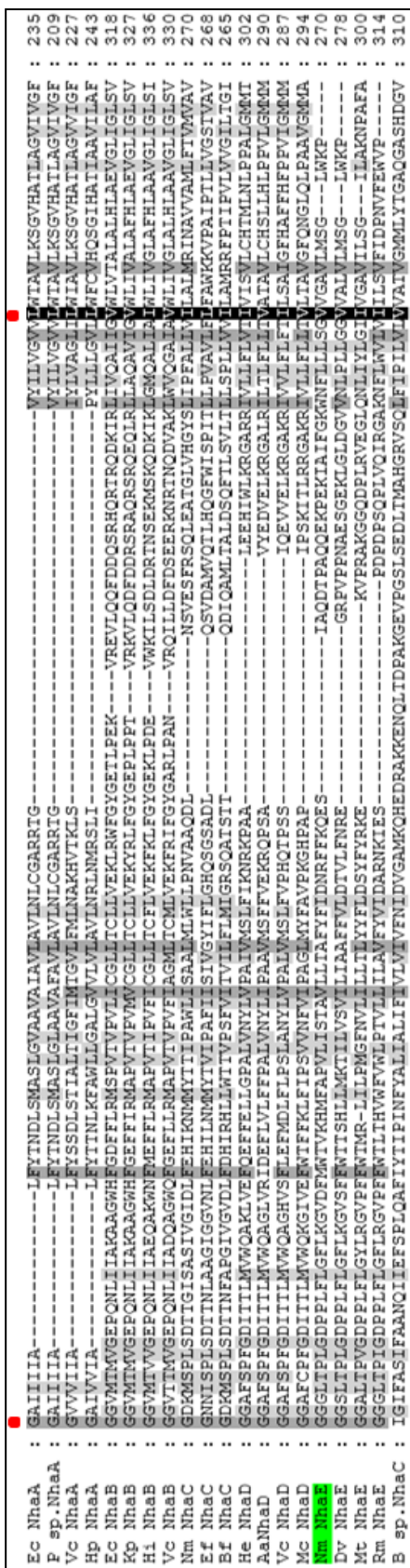


Figura 17. Alinhamento entre seqüências de aminoácidos do NhaA e outros antiporters Na⁺/H⁺ de vários grupos do tipo Nha. O NhaA e NhaB de *E. coli* e o NhaD de *V. cholerae*, usados como referências para cada grupo de antiporter tinham idêntidades entre 7 e 13% e similaridades entre 18 e 30%, respectivamente. A identidade entre NmNhaE e o NmNhaC foi de 9 %, com similaridade de 27%. Destacados a vermelho, encontram-se os resíduos G174 e V258 em *N. meningitidis* escolhidos para a mutagenese dirigida. A verde, está representada a seqüência de aminoácidos do antiporter NhaE de *N. meningitidis*. A preto, encontram-se os resíduos de aminoácidos totalmente conservados em todas as seqüências comparadas. A gradação da cor cinzenta reflete diferentes níveis de conservação dos resíduos de aminoácidos, conservado do mais escuro para o mais claro (Alinhamento completo disponível no Anexo 1) (Ver Anexo 3 para correspondência de código de uma letra de cada aminoácido).

NmNhaE	:	IPFSLVFGASAGIHVAHALVEEYHFFILLLALYITSSGGTLVWGDNGTLPKLTALLAVGTALA	:	133
D vulgaris	:	VPCAAVFGMGTAIYQVLIHTFLELYVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	143
D baculatum	:	VFYALVYGFDLAVYNVHLVFLLEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	149
L intracell	:	IPCAVIFGSLPLTAYQLLHTFLELYVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	142
E corrodens	:	IPFTLYVGFSTLSIVTHALAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	136
K oralis	:	IPFTLIFGTHSLHLIAHAMICEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	136
A vinelandii	:	VVFAFAFGPHDTFAVIVHALFAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	136
L nitroferum	:	LPFTLAFGFGSMASLVHALLAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	135
L hongkongens	:	VPAALYVGTGTAAAGVVAHALVDEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	136
J sp.	:	LPCCAYFFGASTAVHGVAHFAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	143
H arsenic	:	LPCCAYFFGASTAVHGVAHFAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	134
R eutropha	:	LPFAAAFGTHAAAASAGHALLAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	138
B sp.	:	LPFAFAFGSAGTAFGTIVHALLEEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	140
B phymatum	:	IPFAFAFGSAGTAFGTIVHALLEEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	140
D acidovorans	:	LPFAAVFGAAGLVNIVHALAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	136
C testosteroni	:	LPFALVYFGAAGNIVHALAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	133
F naphthalen	:	LPFALYVFGMAAFSLHALLAEYHFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	144
R marinus	:	VSLYYIFGLGS-TTPVVAH-TEEYKSFIALVALEFAASGIMININAKGTPRNNAILLFVGSIVA	:	181
NmNhaE	:	SIMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	198
D vulgaris	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	208
D baculatum	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	214
L intracell	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	207
E corrodens	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	200
K oralis	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	201
A vinelandii	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	201
L nitroferum	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	200
L hongkongens	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	201
J sp.	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	208
H arsenic	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	199
R eutropha	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	203
B sp.	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	205
B phymatum	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	219
D acidovorans	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	201
C testosteroni	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	198
F naphthalen	:	SVMGTTGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	209
R marinus	:	NLIATITGAMNLIIRPILIRANDNRRKRVHVVVFFLILDFALFTVAGGVLKGSLSVGTVPVNTAILAVGTILA	:	245
NmNhaE	:	VKHMFAFVLIISTAVLITAFVFIIDNRFFKQ-----ESIADQTPAQOE-----	:	239
D vulgaris	:	TSHELLMKTILVSVLIIAFAEVLDTIVLFRNE-----GRVFPNRESG-----	:	249
D baculatum	:	TVHMEFVFAVISTILLALYFAIDTVLFRNE-----GRPESPDAQDG-----	:	255
L intracell	:	TIHLEFPMVILSILLITIVFIIDLSLYKKE-----GSPLPQNISDNP-----	:	249
E corrodens	:	VOHMLFPVLIISAVALITVFIIDLSKYFAQA-----DEILAKDPSFDS-----	:	242
K oralis	:	VVHMEFPVLIISTAVLITAFVFIIDLSRYFAA-----DEILPKDPTPDSHFQAAF-----	:	249
A vinelandii	:	VEHMLLPVLISSAADITVFIIDRYFYARE-----DELLPRDPSFDS-----	:	243
L nitroferum	:	VRHMLFVFAALALAVFIIDLSYFYRKE-----G-VLPRDPSFD-----	:	241
L hongkongens	:	LEHMLFVFAASVLIIVFIIDLSYFYRKE-----N-IEADPTFD-----	:	242
J sp.	:	VRHLEFAPTEFICVALLIIVFIIDLSHYHHR-----EIVKPELDP-----T	:	249
H arsenic	:	VRHLEFAPTEFICVALLIIVFIIDLSHYHHR-----EIKKPEQDP-----T	:	240
R eutropha	:	MRNIEFETVFCVLLVLFVILDRHYQNK-----EELPFRSDP-----T	:	244
B sp.	:	TIHLEFAPTEFICVALLIIVFIIDLSYFYRKE-----GEERPAVLDP-----T	:	246
B phymatum	:	TIHLEFAPTEFICVALLIIVFIIDLSYFYRKE-----EIVLP-VDP-----S	:	258
D acidovorans	:	VRHIEFETVFLVGVLLALFYAIDTWLLRKA-----GEADLPDPTPSID---AS	:	246
C testosteroni	:	VSHIWFPMFLITLALAVFIIDLRHLMGR-----GETDLPDPTPSMD---AT	:	243
F naphthalen	:	ASHIEFETVFLIGSLALFYAIDDAWFYHR-----EELMFLDFTF-----D	:	250
R marinus	:	LTHMFPVMEPTVLIHAAVFIIDNRKKE-----SPDFDES-----	:	281
NmNhaE	:	--KPEKIAIEGKWNFLILSGVVAVLMSGLWKPPEHPGFEILG-----SRYALQNLV-----	:	288
D vulgaris	:	---EKLGLDGVVNLPIILGGVVALVMSGLWKPE-VAFNVYG-----IEVELQNLA-----	:	295
D baculatum	:	---GKLRLEGCTANLILLAGVVGVLMSGLWKPQ-VEITVYE-----VHVELQNLIL-----	:	301
L intracell	:	---GOLGIEGKWNFLILLCVVLIVMSGLWKNPD-ISINIYG-----ISIALQDS-----	:	295
E corrodens	:	---PPEKIKLMEKWNFLILGGVVAAMMSGLWKPAPHPGLEIFG-----THYALQNLA-----	:	291
K oralis	:	PAVDGKIKLMEKWNFLILAGVIGAVLMSGLWKPESHGFELG-----AHLEPCQNA-----	:	289
A vinelandii	:	---PKLYGCFNFIILAGVIGAVLMSGLWKPQ-VAIFVYK-----PFIEPCQNA-----	:	286
L nitroferum	:	---PFLKLYGCFNFIILAGVIGAVLMSGLWKPQ-LSIDVVG-----TPLELQNAV-----	:	286
L hongkongens	:	---PFRIFPSENFILIGVIVAVLMSGLWKPQ-IOFEILG-----AKWQLQNL-----	:	287
J sp.	:	PDS-ARFPEGKINFIILGIIVAVLMSGLWKPQ-ISVYFVG-----NIIEQLQNL-----	:	297
H arsenic	:	PDS-ARFPEGKINFIILGAVVALVMSGLWKPQ-IAYSFFG-----NIVELQNL-----	:	288
R eutropha	:	PDSGGIAIEGKFNFIILAVIIGLMSGLWQPP-IAFDVVG-----TEVFLQAAV-----	:	293
B sp.	:	PDNDRLSIDGKINFIILAVIIGLMSGLWKPQ-ITFDVVG-----THVALQNLV-----	:	295
B phymatum	:	PDTRILGAIKGNVFIILALVIALVMSGLWKPQ-ITFDVAG-----THIELQHV-----	:	307
D acidovorans	:	GRASRGGFDKSNVFIILAVVALVMSGLWRID-AGLVLAG-----THVGLPGLV-----	:	295
C testosteroni	:	GRASRGGFDKSNVFIILAVVALVMSGLWRID-AGLVLAG-----THVGLPGLV-----	:	292
F naphthalen	:	TR---SGFDCAANFVILAAVGLVLSGLWKSQ-VVFNIAQ-----TDIGLPGVLV-----	:	297
R marinus	:	--QFLAQIRCAKFLVILVLIISVFIIDPNVFEVFDLHELY-----HIFPFI-----	:	326
NmNhaE	:	LVDHTAGRPINVMFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQALMTG-----	:	401
D vulgaris	:	LV-TRIQQNTIMFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDNHLMG-----	:	404
D baculatum	:	MVKTAEGLDNHTIMFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQRLMT-----	:	413
L intracell	:	LV-FKDQGPVNSMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAATHLMG-----	:	406
E corrodens	:	LVHDAAGNPINTIMFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAHTLMNG-----	:	404
K oralis	:	LVHDAAGKPINAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GNPHELMRG-----	:	412
A vinelandii	:	AVTRTDGTPIDGMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQTMN-----	:	400
L nitroferum	:	LVSGEDGMPVNAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQILMK-----	:	398
L hongkongens	:	LVSTPDQGPIDGMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDFVHLMG-----	:	399
J sp.	:	AVTDGNGQPINAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAATLMT-----	:	409
H arsenic	:	AVTDGNGAFINGMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAATLMT-----	:	400
R eutropha	:	LVTDGNGQPINAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAATLMT-----	:	408
B sp.	:	LVTDGNGQPIDAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQSLMT-----	:	407
B phymatum	:	VVNDTAGQPRDOMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQLMT-----	:	419
D acidovorans	:	AVTRADGTPDPIMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQALMT-----	:	407
C testosteroni	:	AVINADGTPNPFAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQLMT-----	:	404
F naphthalen	:	SVTRPDGTPDPAMIFVFAAGLSSLDNRPTYLFEFNMG-----GDAQAMT-----	:	409
R marinus	:	--HAEOQLTVGM--FYWGIGSSVLDNRPTYLFEFNMG-----GLAAMGKFGLDVNVFEQVRAFEASVHP---	:	442
NmNhaE	:	--TLFHSILAVSAGVEMGALTYIGNPENVMGDAEQRGVPEESFFGYMA-WSVAFLIPVFLVH-----	:	463
D vulgaris	:	--DIPETLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEEQGVPEESFFGYMA-WSGILVPCFLLV-----	:	468
D baculatum	:	--EVG-ILAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAETGGKPEESFFGYMA-WSGILVPSFVLM-----	:	474
L intracell	:	--EWAKTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAVTHGISPEESFFGYML-WSICILPFCFILL-----	:	468
E corrodens	:	--HLFHLLAVSAGVEMGALTYIGNPENVMGDAEQRKVPEESFFGYMA-WSGILVPLFILH-----	:	466
K oralis	:	--ELFHLLAVSAGVEMGALTYIGNPENVMGDAEQRKVPEESFFGYMT-WSGILVPLFILH-----	:	474
A vinelandii	:	--ELPRTLAVSAGVEMGALTYIGNPENVMGDAEQRGVPEESFFGYMG-WSCAILLPFWVLL-----	:	462
L nitroferum	:	--ELPQTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEQGVPEESFFGFLL-WAGVILLPFLAG-----	:	460
L hongkongens	:	--EMASTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEQGVPEESFFGYML-WSGILVPLFVLM-----	:	461
J sp.	:	--TLAGTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEERGKPEESFFGYMA-WSCAILLPFLVLM-----	:	471
H arsenic	:	--IMRATLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEERGERPEESFFAYMA-WSCAILLPFLVLM-----	:	462
R eutropha	:	--RDASTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAENRCVPEESFFGYML-YSGTFLVPLFVIM-----	:	467
B sp.	:	--IGASTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAESRGVPEESFFAYLG-WALVLLIPVFLI-----	:	469
B phymatum	:	--IGASTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAESRGVPEESFFGYLA-WSGIVLPLFIAT-----	:	481
D acidovorans	:	--IMASTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEERGKPEESFFGYMA-WSGIVLPLFVLM-----	:	469
C testosteroni	:	--EMALTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEERGKPEESFFGYML-WSGIVLPLVLM-----	:	466
F naphthalen	:	--TFASTLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAEERDVPEESFFGYML-WSGIVLPLFIIM-----	:	471
R marinus	:	--ETWYFLAAISAGVEMGANTYIGNPENVMGDAENKVPPEESFFMGVTKYSIPILIPYFLI-----	:	505

Figura 18. Comparação entre seqüências de aminoácidos do NmNhaE e algumas seqüências similares consideradas hipotéticas NhaEs. Destacados a vermelho encontram-se os resíduos de aminoácidos escolhidos para mutagenese dirigida. A verde, está representada a seqüência de aminoácidos do antiporter NhaE de *N. meningitidis*. A preto, encontram-se os resíduos de aminoácidos totalmente conservados em todas as seqüências comparadas. A graduação da cor cinzenta reflete diferentes níveis de conservação dos resíduos, conservado do mais escuro para o mais claro (Alinhamento completo disponível no Anexo 2) (Ver Anexo 3 para correspondência de código de uma letra de cada aminoácido).

Foi efetuada uma análise topológica do NmNhaE através do programa TopCons, que utiliza a combinação de vários outros programas de previsão topológica no seu algoritmo (Bernsel *et al.* 2009). Com este tipo de programa é possível prever o número de hélices transmembranares, a posição do C e do N-terminal fora da membrana e também a localização de resíduos de aminoácidos selecionados. Esta análise sugere que o NhaE possui 11 TMS, com o N-terminal localizado no citoplasma e o C-terminal no periplasma (Figura 19). A verificar-se, trata-se de uma topologia diferente do único antiporter cuja estrutura foi até agora resolvida, o EcNhaA, que é constituído por 12 TMS, com o N e o C-terminal situados no citoplasma (Hunte *et al.* 2005). Outros programas revelaram uma topologia diferente, como é o caso do programa TMHMM, que indica 12 TMS, com N e C-terminal no citoplasma, ou o programa TM-Pred que revela 13 TMS, com o N-terminal no citoplasma e o C-terminal no periplasma.

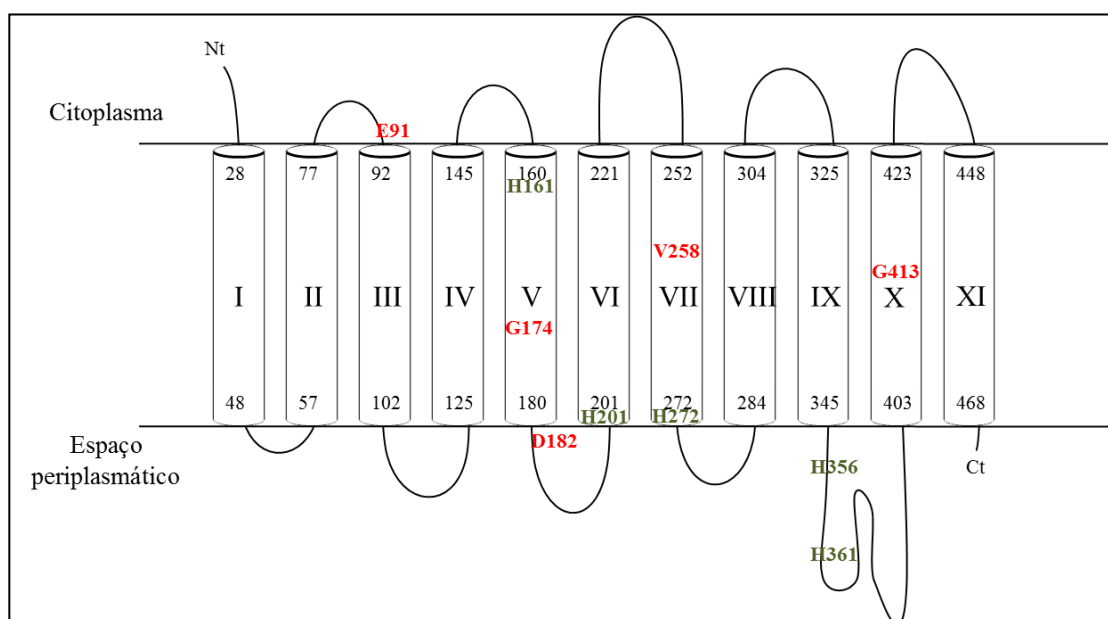


Figura 19. Representação da topologia do NmNhaE, com 11 TMS, calculado pelo programa TopCons (Bernsel *et al.* 2009). As cores estão representadas as posições dos resíduos que foram selecionados para a mutagénese dirigida. A vermelho, os resíduos que poderão estar envolvidos no mecanismo de translocação do Na⁺. A verde, os resíduos que poderão estar envolvidos no mecanismo do pH (Adaptado de Sousa *et al.* 2013).

De acordo com a previsão, os resíduos de aminoácidos com carga negativa E91 e D182 estão localizados em loops hidrofílicos, em fronteira com o TMS III e TMS V, respetivamente (Figura 19). Os resíduos de histidina H161, H201 e H272 encontram-se dentro dos TMS V, VI e VII, também em fronteira com os loops IV, V e VII,

respetivamente (Figura 19). Por sua vez, os resíduos G174, V258 e G413 encontram-se dentro dos TMS V, VII e X, respetivamente. Os dois restantes resíduos de histidina H356 e H361 encontram-se num grande loop hidrofílico existente entre o TMS IX e X, situado do lado periplásmico da membrana (Figura 19).

De acordo com as razões enunciadas, os aminoácidos selecionados para mutação foram os E91, H161, G174, D182, H201, V258, H272, H356, H361 e G413 (Tabela 7). Os aminoácidos substituintes, foram selecionados e introduzidos na sequência *selvagem* por mutagénese dirigida. A seleção teve como base alguns critérios. Os resíduos foram substituídos por grupos que alterassem a propriedade da cadeia lateral sem alteração do tamanho. Assim, os resíduos E91 e D182 foram mutados para glutamina (E91→Q91) e asparagina (D182→N182), respetivamente, de modo a perderem a sua carga negativa do grupo carboxílico, por substituição de um grupo amida. Assim será possível verificar se o grupo carboxilo é importante na constituição dos resíduos de aminoácido. As histidinas foram substituídas por leucinas (H161→L161, H201→L201, H272→L272, H356→L356 e H361→L361), fazendo com que a carga positiva da cadeia lateral deixasse de existir, sem alterar subjetivamente o seu tamanho. As glicinas 174 e 413 foram substituídas por serinas (G174→S174 e G413→S413), possuindo agora uma cadeia lateral polar. O mesmo acontece com a valina 258, substituída por treonina (V258→T258). A sua cadeia lateral apolar foi substituída por uma cadeia lateral polar, que em princípio não afetará o seu tamanho. A mutagénese dirigida originou os mutantes designados por E91Q, H161L, G174S, D182N, H201L, V258T, H272L, H356L, H361L e G413S.

Tabela 7. Principais características dos 10 resíduos de aminoácidos selecionados para mutação no NhaE.

Resíduos	Posição	Mutação	Caracter da Cadeia Lateral	Conservação em NhaE	Conservação em Nha	Provável Função
E91	Loop, entre a hélice II e III	E91→ <u>Q91</u>	Acídico	42/50 (84%)	6/20 (30%)	Translocação de Na ⁺
H161	Hélice V	H161→ <u>L161</u>	Básico	35/50 (70%)	3/20 (15%)	Resposta ao pH
G174	Hélice V	G174→ <u>S174</u>	Hidrofóbico	50/50 (100%)	19/20 (95%)	Translocação de Na ⁺
D182	Loop, entre a hélice V e VI	D182→ <u>N182</u>	Acídico	50/50 (100%)	11/20 (55%)	Translocação de Na ⁺
H201	Hélice VI	H201→ <u>L201</u>	Básico	32/50 (64%)	4/20 (20%)	Resposta ao pH
V258	Hélice VII	V258→ <u>T258</u>	Hidrofóbico	Resíduo hidrofóbico 49/50 (98%)	Resíduo hidrofóbico 20/20 (100%)	Translocação de Na ⁺
H272	Hélice VII	H272→ <u>L272</u>	Básico	2/50 (4%)	1/20 (5%)	Resposta ao pH
H356	Loop, entre a hélice IX e X	H356→ <u>L356</u>	Básico	9/18 (18%)	1/20 (5%)	Resposta ao pH
H361	Loop, entre a hélice IX e X	H361→ <u>L361</u>	Básico	1/50 (2%)	1/20 (5%)	Resposta ao pH
G413	Hélice X	G413→ <u>S413</u>	Hidrofóbico	43/50 (86%)	11/20 (55%)	Translocação de Na ⁺

3.1.4. Análise dos mutantes pontuais do NmNhaE

3.1.4.1. Resistência ao Na⁺

Com o intuito de verificar as diferenças existentes na resistência ao NaCl, a diferentes valores de pH, do antiporter NhaE, após a introdução de mutações pontuais no gene *nhaE*, *E. coli* KNabc foi transformada com o plasmídeo pISC_*nmnhaE* contendo as diferentes mutações pontuais referidas na secção 3.1.3.1. O pISC-2 e o pISC_*nmnhaE* foram ambos transformados em *E. coli* KNabc (*E. coli* KNabc_pISC e *E. coli* KNabc_pISC*nhaE*) e usados como controlo negativo e positivo, respetivamente. Os transformantes foram crescidos em meio LBK líquido com NaCl 500 mM a valores de pH 6.5, 7 e 8, e a indução dos antiporters NhaE foi conseguida pela adição de 15 mM de arabinose, como descrito anteriormente (Material e Métodos – secção 2.4.3.).

Verificou-se que a maior parte dos mutantes selecionados, permitem que a estirpe *E. coli* KNabc cresça nestas condições (Figura 20), indicando que os resíduos E91, D182, H272, H356, G413, H161, V258 e H361 não serão importantes para a atividade de Na⁺/H⁺. A exceção é feita aos mutantes G174S e H201L, que não cresceram em NaCl 500 mM, a qualquer um dos valores de pH testados (Figura 20). As células *E. coli* KNabc onde a expressão dos mutantes D182N, H272L, H356L, G413S e H161L foi induzida, exibem um perfil de crescimento em NaCl 500 mM semelhante ao NhaE selvagem (Figura 20), isto é, a pH 7 apresentam um crescimento mais elevado e a pH 8 apresentam menor crescimento. No último mutante referido não existe grande diferença entre o crescimento a pH 6.5 e 7. Observou-se que tal como em *E. coli* KNabc, que expressa o NhaE selvagem, todos os mutantes que permitem *E. coli* KNabc resistir em NaCl 500 mM apresentam um crescimento mais baixo a pH 8, ou seja, uma OD₆₀₀ inferior. No entanto, em alguns casos, a diferença entre a OD₆₀₀ a pH 8 em relação ao valor da OD₆₀₀ a pH 6.5 e 7 é menor, que a diferença observada no NhaE selvagem (Figura 20). São os casos dos mutantes pontuais H161L, D182N, V258T, H356L e G413S. Por outro lado, as células *E. coli* KNabc que expressam os mutantes H361L, V258T e E91Q, apresentam um perfil de pH diferente (Figura 20). Se no primeiro, a diferença de OD₆₀₀ final do crescimento entre pH 6.5 e 7 não existe, nos dois

últimos o crescimento a pH 6.5 é maior que a pH 7, sendo bastante evidente no mutante E91Q, em que a OD₆₀₀ a pH 6.5 é maior um valor que a pH 7.

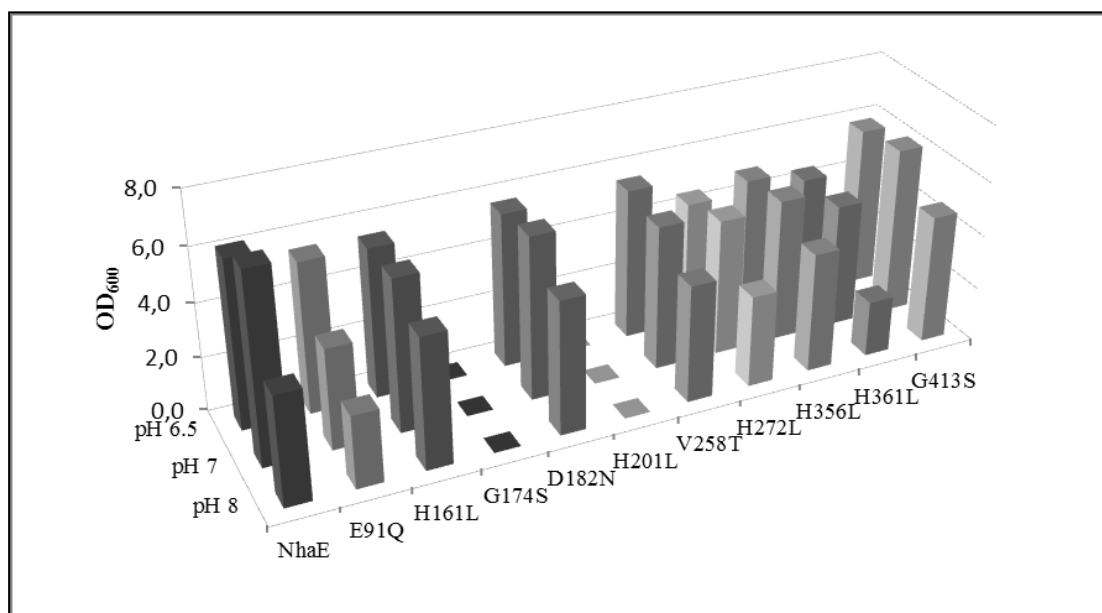


Figura 20. Representação gráfica da resistência de *E. coli* KNabc ao Na⁺, em meio líquido, com NaCl, a diferentes valores de pH, onde a expressão dos mutantes do NmNhaE foi induzida. A maioria dos mutantes do NmNhaE que estão expressos em *E. coli* KNabc conseguem resistir em NaCl 500 mM, aos pHs 6.5, 7 e 8, apenas os mutantes G174S e H201L não crescem nestas condições. Está representado o valor medido da OD₆₀₀ ao fim de 12 horas de crescimento de *E. coli* KNabc.

3.1.4.2. Caracterização cinética dos mutantes pontuais do NmNhaE

Procedeu-se à caracterização cinética dos mutantes pontuais do NmNhaE capazes de conferir resistência ao Na⁺ à estirpe de *E. coli* KNabc, medindo-se a atividade de antiporter Na⁺/H⁺, a pH 7, em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão dos transportadores mutantes pontuais foi induzida, da mesma forma como se procedeu para a expressão da proteína selvagem e descrito anteriormente (Material e Métodos – secção 2.4.3.). Nos mutantes H161L, D182N, H356L e G413S não se observou qualquer atividade de transporte. Determinou-se a amplitude do transporte em resposta à adição de diferentes concentrações de NaCl a pH 7 (Figura 21), para os mutantes E91Q, H272L, V258T e H361L. A amplitude determinada para cada concentração de NaCl resultou numa cinética de Michaelis-Menten para cada mutante (Figura 22.A), que por linearização originou o gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 22.B) do qual pode-se extrapolar os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m (Tabela 8).

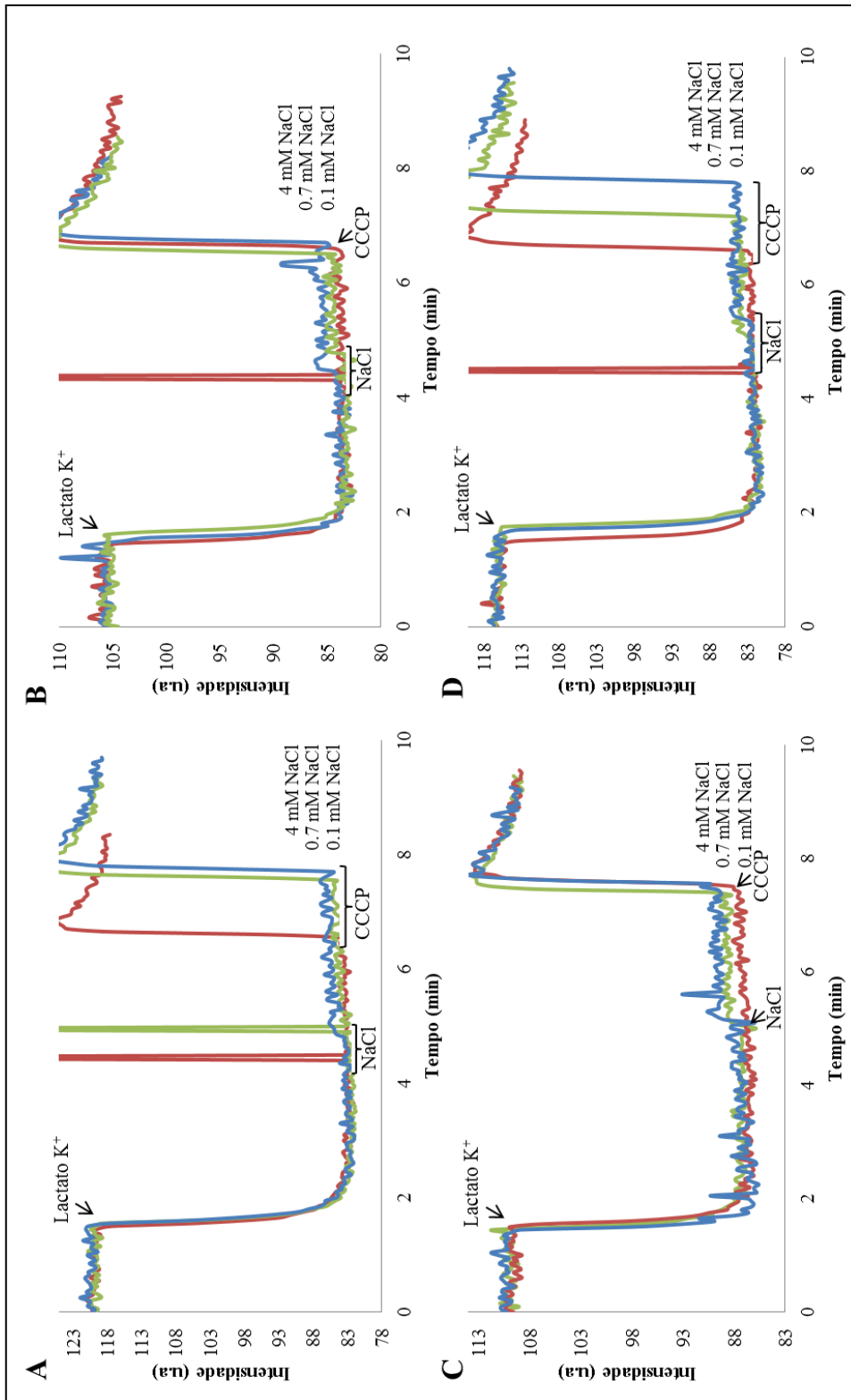


Figura 21. Ensaio de transporte a pH 7, em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão dos mutantes do NmNhaE foi induzida. A atividade de antiporter Na⁺/H⁺ aumenta com o aumento da concentração de NaCl adicionada. A adição dos reagentes está indicada na figura. A- Mutante E91Q; B- Mutante V258T; C- Mutante H272L; D- Mutante H361L. Adição de 0.1 mM de NaCl (—); 0.7 mM de NaCl (—); 4 mM de NaCl (—).

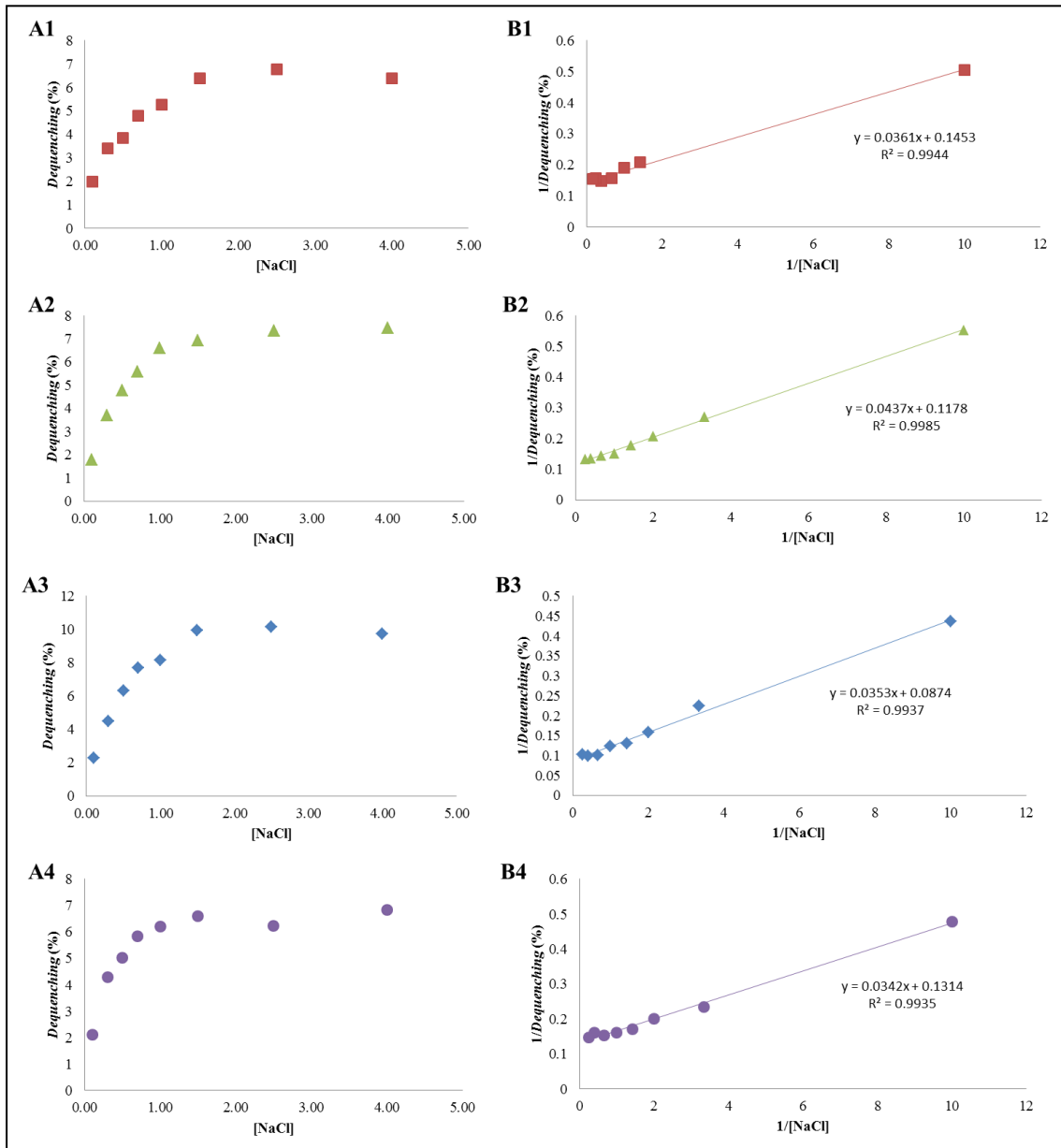


Figura 22. Representações dos gráficos a partir do qual são calculados os parâmetros cinéticos. Foram efetuadas duas réplicas biológicas para cada mutante, e pelo menos três replicados técnicos. **A-** Cinética de Michaelis-Menten. **B-** Gráfico de Lineweaver-Burk. Mutante E91Q (■); Mutante V258T (▲); Mutante H272 (◆); Mutante H361L (●).

Após o cálculo dos parâmetros cinéticos, verificou-se que o mutante H272L mostra um K_m de 0.41 mM e um V_{max} de 11.8 ± 0.3 %DQ (Tabela 8). O K_m deste mutante é duas vezes superior ao K_m do selvagem. Pelo contrário, os restantes mutantes, E91Q, V258T e H361L apresentam valores de K_m semelhantes ao do selvagem. O primeiro tem um K_m de 0.25 mM e os restantes de 0.32 ± 0.06 mM (Tabela 8). A diferença em relação ao selvagem está no V_{max} (12.3 %DQ) que é quase duas vezes inferior nestes mutantes, 6.3 ± 0.4 %DQ, 7.9 ± 0.6 %DQ e 7.6 %DQ (Tabela 8),

Tabela 8. Parâmetros cinéticos dos mutantes pontuais para o Na^+ . Estes parâmetros foram calculados a partir dos gráficos das Figuras 14B e 22B.

	pH 7		pH 7.5	
	K_m (mM)	V_{max} (%DQ)	K_m (mM)	V_{max} (%DQ)
NhaE	0.24±0.07	32±10/12.3*	0.14±0.04	16±3
E91Q	0.25	6.3±0.6	ND	ND

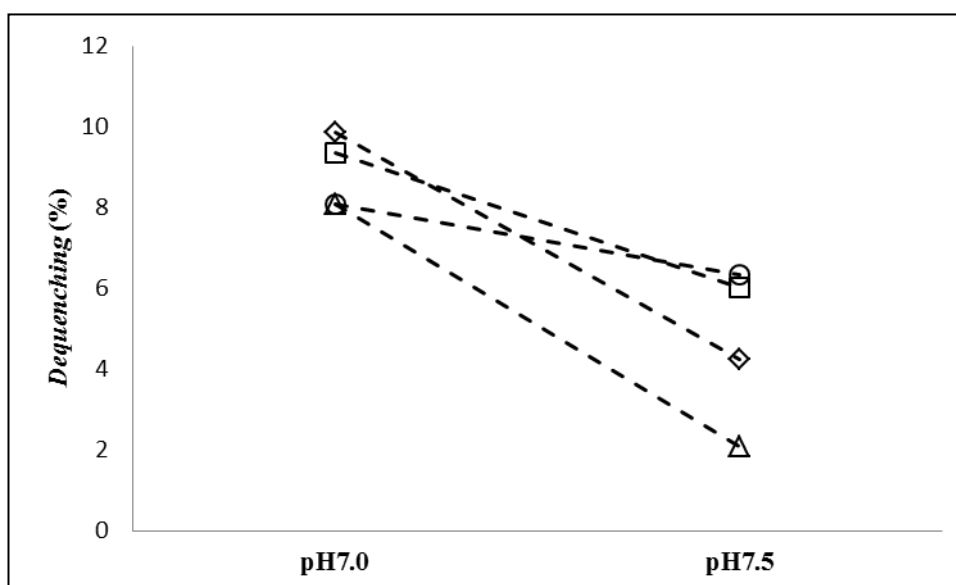
respetivamente.

H161L	SA	SA	ND	ND
G174S	SA	SA	ND	ND
D182N	SA	SA	ND	ND
H201L	SA	SA	ND	ND
V258T	0.32±0.06	7.9±0.6	ND	ND
H272L	0.41	11.8±0.3	ND	ND
H356L	SA	SA	ND	ND
H361L	0.32±0.06	7.6	ND	ND
G413S	SA	SA	ND	ND

SA- sem atividade; ND- não determinado; * V_{max} calculado como controlo para as experiências dos mutantes do NmNhaE.

3.1.4.3. Efeito das mutações na resposta do NmNhaE ao pH

Determinou-se a atividade de antiporter Na^+/H^+ para os vários mutantes a diferentes valores de pH (6.5-9), em resposta à adição de NaCl 4 mM às vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão dos mutantes do NmNhaE foi induzida. Tal como anteriormente, nem todos os mutantes apresentaram atividade de antiporter Na^+/H^+ . As atividades foram medidas nos mutantes E91, V258T e H272L, a pH 7 e 7.5. Dos resultados obtidos, observou-se que existem diferenças nestes mutantes em relação ao NmNhaE selvagem, para as atividade a pH 7 e 7.5 (Figura 23). Os mutantes V258T e H272L apresentam uma atividade de antiporter Na^+/H^+ a pH 7.5 inferior ao selvagem,



verificada principalmente no mutante V258T, que também tem atividade de antiporter Na^+/H^+ inferior à do NhaE selvagem a pH 7. Por outro lado, o mutante E91Q tem uma atividade de antiporter Na^+/H^+ inferior a pH 7, em comparação com o NhaE selvagem, contudo parecida à atividade do NhaE selvagem a pH 7.5 (Figura 23).

Figura 23. Representação gráfica da variação da atividade Na^+/H^+ do NhaE e seus mutantes a pH 7 e 7.5. NhaE (- □ -); E91Q (- ○ -); V258T (- △ -); H272L (- ◇ -).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Discussão

4.1.1. Expressão dos antiporters NmNhaC e NmNhaE em *E. coli* KNabc

O estudo que envolveu os dois antiporters Na^+/H^+ de *N. meningitidis*, NhaC e NhaE, revelou que existem algumas diferenças em relação à sua tolerância ao NaCl, que nos permitem afirmar que o NmNhaE é o antiporter Na^+/H^+ principal do tipo Nha em *N. meningitidis*. De facto, quando a expressão do NhaE foi induzida em *E. coli* KNabc, observou-se que o crescimento em meio LBK líquido, com NaCl 340 mM a pH 7, atingiu uma OD_{600} de 8 após 12 horas de crescimento (Figura 12.A). Nas mesmas condições, verificou-se uma OD_{600} de 5 num crescimento de *E. coli* KNabc onde foi induzida a expressão do NhaC (Figura 10), o que indica que o NhaE é mais ativo que o NhaC, nestas condições. O perfil de crescimento da estirpe KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida varia com o pH, atingindo uma maior taxa e amplitude de crescimento a pH 7 (Figura 13.A). O mesmo sucede quando a expressão do NmNhaC é induzida, apresentando melhor performance de crescimento a pH 7 (Figura 10), mas sempre inferior à performance observada quando a expressão do NmNhaE é induzida. A sensibilidade ao pH sugere que estes transportadores são importantes na manutenção do pH interno de *N. meningitidis*. A uma concentração de NaCl 0.7 M ainda se observa esta variação do perfil de crescimento em função do pH, o que não se verifica a NaCl 1.0 M (Figura 13.B), provavelmente porque a esta concentração, o transportador se encontra saturado. A resistência conferida pelo NhaE à estirpe KNabc a elevadas concentrações de NaCl e a larga gama de valores de pH à qual esta cresce, sugerem que este antiporter Na^+/H^+ desempenhará um papel importante na resistência ao Na^+ , que lhe poderá permitir invadir ambientes onde outras bactérias não conseguem sobreviver.

Quando a sua expressão é induzida, o NhaE também é capaz de conferir resistência ao Li^+ à estirpe KNabc. Quando o NmNhaE é expresso, a *E. coli* KNabc é capaz de sobreviver pelo menos até de 0.4 M de LiCl entre pH 6.5 e 8, condições onde *E. coli* K-12 não cresce. As concentrações usadas de LiCl são inferiores às usadas de NaCl, dado que o Li^+ é mais tóxico para a célula que o Na^+ (Figura 12, secção 3.1.2.1).

4.1.2. Atividade de antiporter Na^+/H^+ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc

Com o estudo da atividade de antiporter Na^+/H^+ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc, procurou-se aprofundar o conhecimento sobre a cinética dos antiporters Na^+/H^+ de *N. meningitidis*. Para o NmNhaC, não foi possível observar atividade de antiporter Na^+/H^+ após a adição de NaCl às vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde foi induzida a expressão do NmNhaC. Contudo, uma vez que o NmNhaC confere resistência ao Na^+ à *E. coli* KNabc, a falta de atividade não indica que a proteína não está funcional. Além disso, não podemos descartar a hipótese deste transportador permutar outros iões.

O NmNhaC foi comparado com outro antiporter Na^+/H^+ do mesmo grupo, revelando algumas diferenças. O NmNhaC permite que *E. coli* KNabc cresça NaCl entre pH 6.5 e 8, enquanto o NhaC de *Bacillus* sp. G1 confere resistência entre pH 8 e 10 suportando elevadas concentrações de NaCl, de 0.2 a 2 M (Liew *et al.* 2007). Sendo *Bacillus* sp. G1 um organismo alcalófilo é de esperar esta diferença.

O NmNhaE apresentou atividade de antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a sua expressão foi induzida, e os parâmetros cinéticos foram calculados a pH 7 e 7.5 (Tabela 6). A pH 7, o NmNhaE tem um K_m de 0.24 ± 0.07 mM e um V_{\max} de 32 ± 10 %DQ para o Na^+ e um K_m de 0.62 ± 0.07 mM e um V_{\max} de 19 ± 1 %DQ para o Li^+ . A pH 7.5 o K_m é de 0.14 ± 0.04 mM para o Na^+ e de 0.45 ± 0.13 mM para o Li^+ e o V_{\max} é 16 ± 3 %DQ para o Na^+ e 11 ± 1 %DQ para o Li^+ . O menor K_m para os dois iões a pH 7.5, tem uma repercussão negativa na velocidade de translocação dos iões, isto porque provavelmente, o aumento da afinidade de ligação dificulta a libertação dos iões Na^+ e Li^+ , diminuindo por isso a velocidade do transporte. O menor K_m para o Na^+ do que para o Li^+ , acompanhado de um maior V_{\max} sugere que este transportador permuta preferencialmente o Na^+ , de acordo com o sugerido pelo comportamento do crescimento de *E. coli* KNabc onde a expressão do NhaE foi induzida. De facto, o ambiente onde a bactéria *N. meningitidis* normalmente habita, nasofaringe e sangue suporta esta necessidade, visto que é mais rico em Na^+ do que em Li^+ , corroborando a sugestão anterior de que o NmNhaE desempenha um papel importante na homeostasia do Na^+ .

A comparação do NmNhaE, com o único antiporter Na^+/H^+ previamente estudado noutro organismo, o NhaE do organismo termóhalofilo *R. marinus*, evidenciou também algumas diferenças. O NmNhaE é capaz de translocar Li^+ , ao contrário do RmNhaE (Melo *et al.* 2006). Quando a sua expressão é induzida em *E. coli* KNabc, o NmNhaE confere resistência a esta estirpe numa gama de pH 6.5 e 8, enquanto o RmNhaE apenas permite que *E. coli* EP432 cresça em pH 6.5 –7.5 (Melo *et al.* 2006).

A atividade de antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ em vesículas invertidas de *E. coli* KNabc onde a expressão do NmNhaE foi induzida, varia num largo espectro de valores de pH, entre pH 6.5 e 9, sendo o seu máximo a pH 7. Não havendo estudos de atividade de antiporter Na^+/H^+ em vesículas invertidas de outro antiporter Na^+/H^+ do tipo NhaE, a comparação da atividade de antiporter Na^+/H^+ do NmNhaE é aqui comparada com antiporters Na^+/H^+ de outros grupos. O EcNhaA, tem um pH ótimo de 8.5 (Padan *et al.* 2004) e o VcNhaD de pH 7.5 (Herz *et al.* 2003), diferente do NmNhaE. Apenas o NhaB de *V. colerae* tem um pH ótimo de 7 (Herz *et al.* 2003). Dos antiporters Na^+/H^+ aqui comparados, nenhum apresenta um espectro de valores de pH tão largo como o NmNhaE. O EcNhaA, o EcNhaB e o VcNhaD possuem atividade entre pH 7 a 8.5 (Padan *et al.* 2004; Pinner *et al.* 1993; Herz *et al.* 2003).

4.1.3. Papel dos resíduos de aminoácidos mutados no NmNhaE

Mutaram-se os resíduos E91, H161, G174, D182, H201, V258, H272, H356, H361 e G413. Tendo como objetivo, estabelecer a relevância de diferentes resíduos de aminoácidos na atividade e estrutura do NmNhaE. Os resíduos de aminoácidos que regulam a resposta ao pH, têm normalmente um pK_a dentro de um pH fisiológico, como é o caso dos resíduos de histidina. Quando mutados, é suposto alterarem o perfil de pH do antiporter sem afetar o K_m do mesmo. Os resíduos de aminoácidos que afetam a translocação dos cátions, estão normalmente dentro de TMS e são normalmente capazes de interatuar com os iões a translocar. A alteração destes aminoácidos, afeta as propriedades cinéticas dos antiporter Na^+/H^+ , nomeadamente a sua K_m , aumentando-a drasticamente sem afetar a resposta ao pH do antiporter Na^+/H^+ (Padan *et al.* 2004; Habibian *et al.* 2005).

Considerando que em *N. meningitidis* o NmNhaE permutará habitualmente Na⁺ por H⁺, efetuou-se a caracterização do antiporte Na⁺/H⁺ nos mutantes pontuais. No entanto, o Li⁺ pode também ser importante para a função e estrutura da proteína, visto que já foi sugerido que este ião pode ter um sítio de ligação diferente do Na⁺, devido a diferenças no raio iónico não hidratado e ao facto do ião Li⁺ necessitar de menos resíduos de coordenação que o Na⁺ (Jiang *et al.*2013), não podendo o seu estudo ser descartado num próximo trabalho.

H361, V258 e E91 importantes na resposta ao pH?

Os mutantes H361L, V258T e E91Q cresceram em meio LBK líquido com NaCl 500 mM, quando a sua expressão foi induzida em *E. coli* KNabc, embora a sua amplitude de crescimento seja menor que a do NhaE selvagem (Figura 20). O facto de terem crescido nestas condições, sugere que estes resíduos de aminoácidos não são cruciais para a atividade de transporte do NmNhaE. Verificou-se que quando a expressão dos mutantes H361L, V258T e E91Q é induzida em *E. coli* KNabc, o seu crescimento atinge uma OD₆₀₀ mais elevada a pH 6.5, ao contrário do NhaE selvagem que cresce melhor a pH 7. Este comportamento do crescimento é mais evidente no mutante E91Q (Figura 20). Pode-se presumir, que estes resíduos de aminoácidos poderão ser importantes na dependência do pH, permitindo que o transportador tenha uma melhor performance a valores de pH mais elevados, nomeadamente entre 7 e 7.5, a gama de pH da nasofaringe e sangue, onde a *N. meningitidis* normalmente habita. O K_m para o Na⁺ destes mutantes a pH 7, 0.25 mM para o E91Q e 0.32 ± 0.06 mM para os restantes, sofreu um aumento ligeiro em relação ao NhaE selvagem, 0.24 ± 0.07 mM (Tabela 8). O mesmo não sucede ao V_{max} a pH 7, que baixou em relação ao NhaE selvagem (12.3 %DQ), 6.3 ± 0.4 %DQ, 7.9 ± 0.6 %DQ e 7.6 %DQ para E91Q, V258T e H361, respetivamente (Tabela 8, secção 3.1.4.2). O facto de não haver grande alteração no K_m para o Na⁺ nos mutantes H361, V258 e E91, e o V_{max} determinado para o Na⁺ ser inferior ao V_{max} determinado para o NhaE selvagem, poderá indicar que estes resíduos são importantes na resposta ao pH.

Pusemos a hipótese do resíduo V258 ser importante na translocação do Na⁺, uma vez que este tipo de resíduo de aminoácido (resíduo hidrofóbico), surge com elevado

grau de conservação no alinhamento de sequências de aminoácidos entre antiporters de diferentes grupos (Figura 17) e também com base na sua posição no interior do TMS VII (Figura 19). Contudo, os valores dos parâmetros cinéticos e as atividades determinadas a pH 7 e 7.5 indicam um possível papel na resposta ao pH. No mutante V258T, as atividades de antiporter Na^+/H^+ medidas a pH 7 e 7.5, são inferiores às do NhaE selvagem (Figura 23). A pH 7.5, a atividade é cerca de três vezes mais baixa que no NhaE selvagem (Figura 23). Estas diferenças na atividade a pH 7 e 7.5 em relação ao NhaE selvagem e juntamente com o facto do K_m para o Na^+ não se alterar em relação ao NhaE selvagem, podem indicar que está a ocorrer uma alteração no perfil do pH do transportador, corroborando um eventual papel do V258 na resposta ao pH. Além disso, um resíduo valina, o V254 do EcNhaA foi também associado à resposta ao pH (Gerchman *et al.* 1999; Padan *et al.* 2004).

O E91 é um resíduo de aminoácido bastante conservado entre antiporters do tipo NhaE, e devido ao seu carácter ácido, poderá ter um papel na translocação do Na^+ . Verificou-se que a atividade de antiporter Na^+/H^+ do mutante E91Q a pH 7 é ligeiramente inferior à determinada para o NhaE selvagem, mantendo-se semelhante à do NhaE selvagem a pH 7.5. Os valores do K_m e do V_{\max} calculados a pH 7 para o mutante E91Q, e a elevada OD_{600} verificada a pH 6.5 em relação a pH 7 e 8, podem indicar que este resíduo está envolvido na resposta ao pH. No resíduo conservado do VcNhaD, E100 que quando mutado para alanina provoca uma menor atividade de antiporter e um *shift* de pH para valores mais alcalinos (Habibian *et al.* 2005). Além disso, outros resíduos de ácido glutâmico já foram anteriormente associados à resposta ao pH, nomeadamente os resíduos E252 (Tzuberly *et al.* 2004; Padan *et al.* 2004) e E241 (Gerchman *et al.* 1999; Padan *et al.* 2004) do EcNhaA que também se encontram em loops, como o E91 do NmNhaE (*loop* entre os TMS II e III), fortalecendo que este resíduo poderá estar envolvido na resposta ao pH.

Relativamente ao resíduo de aminoácido H361, tendo em conta que o V_{\max} para o Na^+ diminuiu em relação ao NhaE selvagem, e o K_m para o Na^+ se alterou significativamente, é muito provável que este resíduo esteja também envolvido na resposta ao pH. O facto deste resíduo se encontrar num grande loop hidrofílico do lado periplasmático da membrana, apoia também esta provável função.

Função do Resíduo H272

Como anteriormente referido, os resíduos de histidina têm vindo a ser associados à resposta ao pH (Padan *et al.* 2004; Habibian *et al.* 2005), por isso era presumível que o H272 tivesse esse papel no NmNhaE. A pH 7, verificou-se que o K_m para o Na^+ aumenta em relação ao NhaE selvagem e o V_{max} mantém-se constante (Tabela 8). A pH 7.5, a atividade de antiporter Na^+/H^+ diminui em relação ao NhaE selvagem, embora a pH 7 a atividade mantém-se semelhante. A substituição da histidina por um resíduo hidrofóbico, sem carga positiva, a leucina, faz com que o transportador tenha uma menor afinidade para o Na^+ , sugerindo que o H272 tem um papel na translocação do Na^+ . Contudo, a diminuição da atividade a pH 7.5 poderá também indicar que o H272 esteja envolvido na resposta ao pH. A contribuição de um resíduo de histidina tanto na resposta ao pH como na translocação do Na^+ já foi demonstrado e descrito para a H93 do VcNhaD (Habibian *et al.* 2005).

Resíduos sem atividade de antiporter Na^+/H^+ , H161, D182, H356, G413 G174 e H201

Quando expressos em *E. coli* KNabc, os dois mutantes pontuais, G174S e H201L, não conseguiram que esta tolerasse NaCl 500 mM ao contrário do observado para o NhaE selvagem (Figura 20), o que sugere que os resíduos G174S e H201L são cruciais para a atividade do transportador. Por outro lado nos mutantes, H161L, D182N, H356L e G413S não se observou atividade de antiporter Na^+/H^+ . Contudo, estes mutantes conseguiram conferir resistência ao Na^+ à *E. coli* KNabc quando a sua expressão foi induzida, sugerindo que H161, D182, H356 e G413 não são cruciais na translocação do Na^+ .

A hipótese inicial sugeria que a H161 e a H356 estariam envolvidas na resposta ao pH. Uma vez que não se obteve atividade de antiporter Na^+/H^+ não é possível confirmar o seu papel no transportador, mas com base no crescimento verificado em *E. coli* KNabc quando a expressão dos mutantes pontuais destes resíduos foi induzida, e uma vez que estes resíduos têm um pKa dentro de um pH fisiológico, o papel da hipótese inicial continua a ser a mais adequada para explicar a eventual função destes resíduos no antiporter Na^+/H^+ . Além disso, a localização da H356 no loop hidrofílico

entre os TMS IX e X, onde se encontra também o resíduo de aminoácido H361 (Figura 19) sugere igualmente um possível papel na resposta ao pH.

A elevada conservação do resíduo D182 em antiporters do tipo NhaE e o facto de ser um resíduo ácido apontavam para que o mutante D182N perdesse a atividade de antiporter Na^+/H^+ quando expresso em *E. coli* KNabc. Isto acontece no resíduo conservado, D199 no VcNhaD (Habibian *et al.* 2005), que quando mutado para alanina D199A, provocou a inativação do antiporter para o Na^+ e Li^+ . Apesar do resíduo D182 não estar posicionado no interior de um TMS, como acontece no resíduo conservado no VcNhaD, D199, este encontra-se muito perto do TMS V (figura 19), tendo já sido demonstrado, num estudo anterior, que a atividade de antiporter Na^+ e Li^+ é abolida num resíduo com esta localização, D344 do VcNhaD (Oustroumov *et al.* 2002), um resíduo muito próximo do TMS X. No mutante D182N isto não acontece, quando a sua expressão é induzida na estirpe KNabc, esta é capaz de resistir em NaCl 500 mM (Figura 20). Contudo, a substituição por outro resíduo que não a asparagina, como por exemplo a alanina, poderia ter esse efeito (Jiang *et al.* 2013). Uma atividade de antiporter Na^+/H^+ mais baixa relativamente ao NmNhaE poderia sugerir um papel na translocação do Na^+ , e o facto de não termos obtido atividade neste mutante poderá indicar isso.

Era de esperar que o resíduo de aminoácido G413, conservado entre antiporters do tipo NhaE, e também nos NhaA de *E. coli* e *H. pylori*, estivesse envolvido na translocação do Na^+ . A sua localização topológica a meio do TMS X (figura 19), é semelhante no EcNhaA e no HpNhaA, em que os resíduos conservados ao G413, o G338 e o G385, respetivamente, estão ambos situados a meio do TMS XI (Rothman *et al.* 1996; Padan *et al.* 2004; Kuwabara *et al.* 2006). Quando a expressão do mutante G413 é induzida, *E. coli* KNabc é capaz de tolerar NaCl 500 mM. Contrariamente, uma mutação semelhante no G385, do HpNhaA, não permitiu o crescimento da bactéria. Por outro lado, pode indicar, que este resíduo poderá ser importante na dependência do pH como no resíduo conservado, G338, no EcNhaA, que provoca um *shift* no perfil de pH, para pH mais ácido (Rimon *et al.* 1998).

O resíduo de aminoácido G174 é bastante conservado entre antiporters do tipo Nha, podendo ter um papel relevante na translocação de Na^+ . Provavelmente, a troca de uma glicina por um resíduo polar e maior, como a serina, dentro do TMS V (Figura 19), poderá perturbar o ambiente hidrofóbico no interior do TMS. O mesmo não acontece, quando se alterou os resíduos G413 e V258 que estão também ambos no interior de um TMS, o TMS X e VII, respectivamente. Apesar de sofrer a mesma mutação que o resíduo G174, quando a expressão do mutante G413S foi induzida, conferiu resistência a *E. coli* KNabc ao contrário do G174S. No resíduo V258, a substituição de um resíduo apolar, valina, por um resíduo polar, treonina, não aboliu a atividade de antiporter Na^+/H^+ ou a capacidade de permitir que *E. coli* KNabc crescesse em meio com NaCl. Assim, talvez o resíduo de aminoácido G174 esteja situado num TMS mais importante para a atividade, por exemplo perto de um sítio de ligação ao Na^+ , como acontece no EcNhaA em que o resíduo G174, conservado no EcNhaA (G166), está próximo dos resíduos D163 e D164, importantes para a translocação dos íons (Padan *et al.* 2004; Hunte *et al.* 2005; Kuwabara *et al.* 2006; Padan *et al.* 2009).

O resíduo H201, contrariamente ao que era esperado na nossa hipótese inicial, que o considerava ser importante para a resposta ao pH, mostrou-se também importante na translocação do Na^+ . A sua substituição por leucina, L201, aboliu o crescimento da *E. coli* KNabc onde a expressão do transportador mutante tinha sido induzida. Pela primeira vez, os resultados sugerem que um resíduo de histidina seja crítico para a atividade de um antiporter Na^+/H^+ Nha, embora outro resíduo positivo, a arginina, já tenha sido considerado crucial para a atividade no HdNhaH (Jiang *et al.* 2013) e no NhaP1 de *Methanococcus jannaschii* (Hellmer *et al.* 2003; Padan *et al.* 2004). Estes dois resíduos, G174 e H201, afetando o antiporte Na^+/H^+ , poderão ser importantes para a estrutura da proteína, ou para alterações conformacionais que possam ocorrer durante a translocação. Além disso, é também possível especular que os TMS V e VI poderão ser importantes na translocação e coordenação do Na^+ .

4.2. Conclusões e considerações finais

Nesta dissertação, confirmou-se que as duas ORFs NMB0536 e NMB0570 codificam antiporters Na^+/H^+ , do tipo NhaC e NhaE, respetivamente. Estes, quando expressos numa estirpe deficiente em antiporters Na^+/H^+ , permitem-lhe crescer na presença de concentrações elevadas de NaCl. As diferenças existentes nos dois antiporters Na^+/H^+ em termos de resistência ao NaCl, sugerem que o NmNhaE é o antiporter principal do tipo Nha em *N. meningitidis*, a participar na homeostasia do Na^+ e do pH. Considerando que *N. meningitidis* não possui sistema Mrp pode-se especular que estes sejam os principais antiporters Na^+/H^+ da bactéria. O NmNhaE pode transportar tanto Na^+ como Li^+ , mas possui uma maior afinidade para o Na^+ . A atividade do NmNhaE é também altamente dependente do pH, com atividade entre pH 6.5 até 9, com um máximo de atividade a pH 7. De facto, esta atividade, numa larga gama de valores de pH, e as elevadas concentrações de Na^+ que este transportador consegue suportar sugerem que a bactéria *N. meningitidis* possui uma vantagem para resistir ao Na^+ em diferentes ambientes. O estudo de mutantes pontuais do NmNhaE mostrou que alguns resíduos poderão modelar a resposta deste transportador ao pH (como E91, V258 e H361), enquanto outros serão importantes na coordenação do Na^+ (como G174 e H201). O resíduo H272 poderá ter uma dupla função, participando tanto na translocação do Na^+ como na resposta ao pH. Não se observou atividade de antiporter Na^+/H^+ nos mutantes dos resíduos H161, D182, H356 e G413, contudo a expressão dos mutantes dos resíduos H161, D182, H356 e G413 em *E. coli* KNabc possibilitou o crescimento desta estirpe em meio com NaCl, deixando em aberto uma influência no transporte, cuja importância está por esclarecer. Ainda, os TMS V e VI parecem ser importantes na translocação do Na^+ . A determinação da atividade de antiporter Na^+/H^+ em alguns destes resíduos e noutros resíduos do NmNhaE igualmente importantes, poderá fornecer uma resposta mais completa e ajudar a compreender melhor como é efetuado o antiporte, e quais os resíduos importantes no sítio de ligação ao ião. *A posteriori*, e a médio prazo, estes dados poderão ser importantes, na prevenção e combate à infeção por parte desta bactéria.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A. & Elofsson, A. 2009. TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Research*, 37, pp. w465-w468.
- Bertrand, S. Van Meervenne, E., De Baere, T., Vanhoof, R., Collard, J., Ruckly, C., Taha, M. & Carion, F. 2011. Detection of a geographical and endemic cluster of hyper-invasive meningococcal strains. *Microbes and infection*, 13 (7), pp. 684-690.
- Bogachev, A. & Verkhovsky, M. 2005. Na⁺-Translocating NADH:quinone oxidoreductase: progress achieved and prospects of investigations. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70 (2), pp. 143-149.
- Bratcher, H., Bennett, J. & Maiden, M. 2012. Evolutionary and genomic insights into meningococcal biology. *Future microbiology*, 7, pp. 873-885.
- Chang, A., Lin, R., Keith Studley, W., Tran, C. & Saier, M. 2004. Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Molecular membrane biology*, 21 (3), pp. 171-181.
- Devoe, I. W. 1982. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiological Reviews*, 46 (2), pp. 162-190.
- Dimroth, P. 1994. Bacterial sodium ion-coupled energetics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65 (4), pp. 381-95.
- Dzioba, J., Ostroumov, E., Winogrodzki, A. & Dibrov, P. 2002. Cloning, functional expression in *Escherichia coli* and primary characterization of a new Na⁺/H⁺ antiporter, NhaD, of *Vibrio cholerae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 229, pp. 119–124.
- Dzioba-Winogrodzki, J., Winogrodzki, O., Krulwich, T., Boin, M., Häse, C. & Dibrov, P. 2009. The *Vibrio cholerae* Mrp system: cation/proton antiport properties and enhancement of bile salt resistance in a heterologous host. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16 (3), pp. 176-186.
- Ferreira, E., Dias, R. & Caniça, M. 2006. Antimicrobial susceptibility, serotype and genotype distribution of meningococci in Portugal, 2001-2002. *Epidemiology and infection*, 134 (6), pp. 1203-1207.

- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P. L. & Panatto, D. 2012. *Neisseria meningitidis*, pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 53 (2), pp. 50-55.
- Gerchman, Y., Olami, Y., Rimon, A., Taglicht, D., Schuldiner, S. & PADAN, E. 1993. Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (4), pp. 1212-1216.
- Gerchman, Y., Rimon, A. & Padan, E. 1999. A pH-dependent conformational change of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* involves loop VIII-IX, plays a role in the pH response of the protein, and is maintained by the pure protein in dodecyl maltoside. *The Journal of biological chemistry*, 274 (35), pp. 24617-24624.
- Gerchman, Y., Rimon, A., Venturi, M. & Padan, E. 2001. Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. *Biochemistry*, 40 (11), pp. 3403-3412.
- Gouda, T., Kuroda, M., Hiramatsu, T., Nozaki, K., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. 2001. nhaG Na⁺/H⁺ antiporter gene of *Bacillus subtilis* ATCC9372, which is missing in the complete genome sequence of strain 168, and properties of the antiporter. *Journal of Biochemistry*, 130 (5), pp. 711-717.
- Habibian, R., Dzioba, J., Barrett, J., Galperin, M., Loewen, P. & Dibrov, P. 2005. Functional analysis of conserved polar residues in Vc-NhaD, Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio cholerae*. *The Journal of biological chemistry*, 280 (47), pp. 39637-39643.
- Halperin, S., Bettinger, J., Greenwood, B., Harrison, L., Jelfs, J., Ladhani, S., McIntyre, P., Ramsay, M. & Sáfadi, M. 2012. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*, 30 (2), pp. B26-B36.
- Häse, C. & Mekalanos, J. 1999. Effects of changes in membrane sodium flux on virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (6), pp. 3183-3187.
- Häse, C., Fedorova, N., Galperin, M. & Dibrov, P. 2001. Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (3), pp. 353-370.

- Hellmer, J., Teubner, A. & Zeilinger, C. 2003. Conserved arginine and aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*. *FEBS Letters*, 542 (1), pp. 32-36.
- Herz, K., Vimont, S., Padan, E. & Berche, P. 2003. Roles of NhaA, NhaB, and NhaD Na⁺/H⁺ antiporters in survival of *Vibrio cholerae* in a saline environment. *Journal of Bacteriology*, 185 (4), pp. 1236-1244.
- Hill, D., Griffiths, N., Borodina, E. & Virji, M. 2010. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clinical science*, 118 (9), pp. 547-564.
- Hiramatsu, T., Kodama, K., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. 1998. A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180 (24), pp. 6642-6648.
- Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E. & Michel, H. 2005. Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature*, 435 (30), pp. 1197-1202.
- Inoue, H., Sakurai, T., Ujike, S., Tsuchiya, T., Murakami, H. & Kanazawa, H. 1999. Expression of functional Na⁺/H⁺ antiporters of *Helicobacter pylori* in antiporter-deficient *Escherichia coli* mutants. *Federation of European Biochemical Societies. Lett*, 443, pp. 11-16.
- Ito, M., Guffanti, A. A., Oudega, B. & Krulwich, T. 1999. mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na⁺ and in pH homeostasis. *Journal Bacteriology*, 181 (8), pp. 2394-2402.
- Ito, M., Guffanti, A. A., Wang, W. & Krulwich, T. A. 2000. Effects of nonpolar mutations in each of the seven *Bacillus subtilis* mrp genes suggest complex interactions among the gene products in support of Na⁺ and alkali but not cholate resistance. *Journal of bacteriology*, 182 (20), pp. 5663-5670.
- Ito, M., Guffanti, A. A., Zemsky, J., Ivey, D. & Krulwich, T. 1997. Role of the nhaC-encoded Na⁺/H⁺ antiporter of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. *Journal of bacteriology*, 179 (12), pp. 3851-3857.

- Jiang, J., Wang, L., Zou, Y., Lu, W., Zhao, B., Zhang, B., Yang, S. & Yang, L. 2013. Identification of important charged residues for alkali cation exchange or pH regulation of NhaH, a Na^+/H^+ antiporter of *Halobacillus dabanensis*. *Biochimica et biophysica acta*, 1828 (3), pp. 997-1003.
- Karpel, R., Olami, Y., Taglicht, D., Schuldiner, S. & Padan, E. 1988. Sequencing of the gene ant which affects the Na^+/H^+ antiporter activity in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 263 (21), pp.10408-10414.
- Kosono, S., Haga, K., Tomizawa, R., Kajiyama, Y., Hatano, K., Takeda, S., Wakai, Y., Hino, M. & Kudo, T. 2005. Characterization of a multigene-encoded sodium/hydrogen antiporter (sha) from *Pseudomonas aeruginosa*: its involvement in pathogenesis. *Journal of bacteriology*, 187 (15), pp. 5242-5248.
- Krulwich, T., Sachs, G. & Padan, E. 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature reviews. Microbiology*, 9 (5), pp. 330-343.
- Kudo, T., Hino, M., Kitada, M. & Horikoshi, K. 1990. DNA sequences required for the alkaliphily of *Bacillus sp.* strain C-125 are located close together on its chromosomal DNA. *Journal Bacteriology*, 172 (12), pp. 7282-7283.
- Kurz, M., Brünig, A. & Galinski, E. 2006. NhaD type sodium/proton-antiporter of *Halomonas elongata*: a salt stress response mechanism in marine habitats? *Saline systems*, 2 (10), pp. 1-12.
- Kuwabara, N., Inoue, H., Tsuboi, Y., Mitsui, K., Matsushita, M. & Kanazawa, H. 2006. Structure-function relationship of the fifth transmembrane domain in the Na^+/H^+ antiporter of *Helicobacter pylori*: Topology and function of the residues, including two consecutive essential aspartate residues. *Biochemistry*, 45 (49), pp. 14834-14842.
- Liew, C., Ilias, R., Mahadi, N. & Najimudin, N. 2007. Expression of the Na^+/H^+ antiporter gene (g1-nhaC) of alkaliphilic *Bacillus sp.* G1 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 276 (1), pp. 114-122.
- LINEWEAVER H & BURK D. 1934 The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, pp. 658-66.

- Melo, A.M.P., Felix, N.A., Carita, J.N., Saraiva, L.M. & Teixeira, M. 2006. The Na⁺/H⁺ antiporter of the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 348 (3), pp. 1011-1017.
- Morino, M., Natsui, S., Ono, T., Swartz, T., Krulwich, T. & Ito, M. 2010. Single site mutations in the hetero-oligomeric Mrp antiporter from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 that affect Na⁺/H⁺ antiport activity, sodium exclusion, individual Mrp protein levels, or Mrp complex formation. *The Journal of biological chemistry*, 285 (40), pp. 30942-30950.
- Nakamura, T., Enomoto, H. & Unemoto, T. 1996. Cloning and sequencing of nhaB gene encoding an Na⁺/H⁺ antiporter from *Vibrio alginolyticus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1275 (3), pp. 157-160.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. New York. W. H. Freeman and Company.
- Nicholls, D. G. & Ferguson, S.J. 2002. *Bioenergetics*3. Third Edition. London & California. Academic Press.
- Nozaki, K., Inaba, K., Kuroda, T., Tsuda, M. & Tsuchiya, T. 1996. Cloning and sequencing of the gene for Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222, pp. 774-779.
- Nozaki, K., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. 1998. A new Na⁺/H⁺ antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1369 (2), pp. 213-220.
- Ostroumov, E., Dzioba, J., Loewen, P. & Dibrov, P. 2002. Asp³⁴⁴ and Thr³⁴⁵ are critical for cation exchange mediated by NhaD, Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio cholera*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1584 (1), pp. 99-106.
- Padan, E. & Schuldiner, S. 1993. Na⁺/H⁺ antiporters, molecular devices that couple the Na⁺ and H⁺ circulation in cells. *Journal of Bioenergetics Biomembranes*, 25 (6), pp. 647-669.
- Padan, E. & Schuldiner, S. 1994. Molecular physiology of the Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Biology*, 196, pp. 443-456.

- Padan, E. 2008. The enlightening encounter between structure and function in the NhaA $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter. *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (9), pp. 435-443.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M. & Krulwich, T. 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1717, pp. 67-88.
- Padan, E., Kozachkov, L., Herz, K. & Rimon, A. 2009. NhaA crystal structure: functional-structural insights. *The Journal of experimental biology*, 212 (11), pp. 1593-1603.
- Padan, E., Tzuber, T., Herz, K., Kozachkov, L., Rimon, A. & Galili, L. 2004. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658, pp. 2-13.
- Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y. & Dover, N. 2001. $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1505, pp. 144-157.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D. Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25 (13), pp. 1605-1612.
- Pinner, E., Kotler, Y., Padan, E. & Schuldiner, S. 1993. Physiological role of nhaB, a specific $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 268 (3), pp. 1729-1734.
- Pinner, E., Padan, E. & Schuldiner, S. 1992. Cloning, sequencing, and expression of the nhaB gene, encoding a $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 267 (16), pp. 11064-11068.
- Pinner, E., Padan, E. & Schuldiner, S. 1994. Kinetic properties of NhaB, a $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 269 (42), pp. 26274-26279.
- Rimon, A., Gerchman, Y., Kariv, Z. & Padan, E. 1998. A point mutation (G338S) and its suppressor mutations affect both the pH response of the NhaA- $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter as well as the growth phenotype of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 273 (41), pp. 26470-26476.

- Robertson, J. W. F., Kasianowicz, J. J. & Banerjee, S. 2012. Analytical Approaches for Studying Transporters, Channels and Porins. *Chemical. Reviews*, 112, pp. 6227–6249.
- Rosen, B. P. 1986. Ion extrusion systems in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 125, pp. 328–336.
- Rothman, A., Padan, E. & Schuldiner, S. 1996. Topological analysis of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 271 (50), pp. 32288–32292.
- Rouphael, N. G. & Stephens, D. 2012. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 799, pp. 1-20.
- Saier, M. H., Tran, C. V. & Barabote, R. D. 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research*, 34, D181-D186.
- Saier, M. H., Yen, M. R., Noto, K., Tamang, D. G. & Elkan, C. 2009. The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Research*, 37, D274-D278.
- Saier, M., Beatty, J., Goffeau, A., Harley, K., Heijne, W., Huang, S., Jack, D., Jähn, P., Lew, K., Liu, J., Pao, S., Paulsen, I., Tseng, T. & Virk, P. 1999. The major facilitator superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1 (2), pp. 257-279.
- Santos, L. C., Simões, J., Severo, M., Vazquez, J. & Lecour, H. 2007. Bacterial meningitis in an urban area: etiologic study and prognostic factors. *Infection*, 35 (6), pp. 406-413.
- Schoen, C., Joseph, B., Claus, H., Vogel, U. & Frosch, M. 2007. Living in a changing environment: insights into host adaptation in *Neisseria meningitidis* from comparative genomics. *International journal of medical microbiology:IJMM*, 297, pp. 601-613.
- Simões, M., Cunha, M., Almeida, F., Furtado, C. & Brum, L. 2009. Molecular surveillance of *Neisseria meningitidis* capsular switching in Portugal, 2002-2006. *Epidemiology and infection*, 137 (2), pp. 161-165.
- Skulachev, V. P. 1989. The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 21 (6), pp. 635-647.

- Sousa, P.M.F., Videira, M.A.M., Vorburger, T., Silva, S.T.N., Moir, J.W., Steuber, J. & Melo, A.M.P. 2013. The novel NhaE-type Na⁺/H⁺ antiporter of the pathogenic bacterium *Neisseria meningitidis*. *Archives of microbiology*, 195 (3), pp. 211-217.
- Stephens, D. 2007. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiology Reviews*, 31 (1), pp. 3-14.
- Stephens, D. 2009. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 27 (Suppl 2), pp. B71-B77.
- Swartz, T., Ikewada, S., Ishikawa, O., Ito, M. & Krulwich, T. 2005. The Mrp system: a giant among monovalent cation/proton antiporters? *Extremophiles: life under extreme conditions*, 9, pp. 345-354.
- Tettelin, H., Saunders, N., Heidelberg, J., Jeffries, A., Nelson, K., Eisen, J., Ketchum, K., Hood, D., Peden, J., Dodson, R., Nelson, W., Gwinn, M., Deboy, R., Peterson, J., Hickey, E., Haft, D., Salzberg, S., White, O., Fleischmann, R., Dougherty, B., Mason, T., Ciecko, A., Parksey, D., Blair, E., Citti, H., Clark, E., Cotton, M., Utterback, T., Khouri, H., Qin, H., Vamathevan, J., Gill, J., Scarlato, V., Maignani, V., Pizza, M., Grandi, G., Sun, L., Smith, H., Fraser, C., Moxon, E., Rappuoli, R. & Venter, J. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 287 (5459), pp. 1809-1815.
- Tokuda, H. & Unemoto, T. 1984. Na⁺ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (12), pp. 7785-7790.
- Tsuboi, Y., Inoue, H., Nakamura, N. & Kanazawa, H. 2003. Identification of membrane domains of the Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) protein from *Helicobacter pylori* required for ion transport and pH sensing. *The Journal of biological chemistry*, 278 (24), pp. 21467-21473.
- Tzuberly, T., Rimon, A. & Padan, E. 2004. Mutation E252C increases drastically the Km value for Na⁺ and causes an alkaline shift of the pH dependence of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 279 (5), pp. 3265-3272.

- Utsugi, J., Inaba, K., Kuroda, T., Tsuda, M. & Tsuchiya, T. 1998. Cloning and sequencing of a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1398, pp. 330-334.
- Van Deuren, M., Brandtzaeg, P. & Van Der Meer J. W. 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), pp. 144-166.
- Vimont, S. & Berche, P. 2000. NhaA, an Na⁺/H⁺ antiporter involved in environmental survival of *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, 182 (10), pp. 2937-2944.
- Vorburger, T., Steina, A., Zieglerb, U., Kaimc, G. & Steubera, J. 2009. Functional role of a conserved aspartic acid residue in the motor of the Na⁺-driven flagellum from *Vibrio cholera*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1787 (10), pp. 1198–1204.
- Waser, M., Hess-Bienz, D., Davies, K. & Solioz, M. 1992. Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (8), pp. 5396-5400.
- Weichselbaum, A. 1887. Uber die aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis. *MMW - Fortschritte der Medizin*, 5, pp. 573-575.
- West, I. C. & Mitchell, P. 1974. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, 144 (1), pp. 87-90.
- Williams, K. 2000. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature*, 403 (6765), pp. 112-115.
- Williams, K., Geldmacher-Kaufer, U., Padan, E., Schuldiner, S. & Kühlbrandt, W. 1999. Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution. *The EMBO Journal*, 18 (13), pp. 3558-3563.
- Xiang, M., Feng, M., Muend, S. & Rao, R. 2007. A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (47), pp. 18677-18681.

Yang, L., Jiang, J., Zhao, B., Zhang, B., Feng, D. Q., Lu, W., Wang, L. & Yang, S. 2006. A Na⁺/H⁺ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T: cloning and molecular characterization. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Lett*, 255, pp. 89-95.

Yazdankhah, S. & Caugant, D. 2004. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (9), pp. 821-832.

Yeagle, P. 2001. Cell Membrane Features. *Encyclopedia of life sciences*, pp. 1-7.

Zaydman, M., Silva, J. & Cui, J. 2012. Ion Channel Associated Diseases: Overview of Molecular Mechanisms. *Chemical reviews*, 112 (12), pp. 6319–6333.

ANEXOS

Anexo 1- Alinhamento de seqüências de aminoácidos do NmNhaE e outros antiporters Na^+/H^+ de vários grupos do tipo Nha (NhaA, NhaB, NhaC e NhaD) usados como referências para cada grupo de antiporter.

```

Ec NnaA : * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
P sp.NhaA : -----MKHLHRFFSSDASGGIILIIAAILMIMANSGATSGWYHDFLETPOLRVGSLEIKNKMLININDA : 66
Vc NnaA : -----MSDMI RDEFFKMSAGGILLVIAAAMVITANSAMGEG-YOAFIHTVFG-----MSVSHNINDG : 40
Hp NnaA : -----MNIKRTENALSLILKNIKSSFGGIFLINAIVAMVANSFLKES-YFALNHTPEFGQIGDFEFTGSLHNINDV : 75
Kp NnaB : -----MANFLGOSPMMYKALIIELIYVPLIEF-ISPEVAGMLDYAEFETFLAMAKCYKLLPGLLAIEAVFIKMTSAEHREEVAAALEV : 86
H1 NnaB : -----MEISYG-RALNRNFILOQSPMYKALIIELIYVPLIEF-VAPVAGMLDYAEFETFLAMAKCYKLLPGLLAIEADLIIGMTSPAHREEVAAALEV : 95
Vc NnaB : -----MIKMEFMTNIOAFMKNFELASPEMYKALIIELIYVPLIEFISPEVAGMLDYAEFETFLAMAKCYKLLPGLLAIEAIIIGMTNAKHVKAELTANIEV : 102
Nm NnaC : -----MPSLIG-NAFIKNFLEKAPMYKVAIIAELIYVPLIEFISPEVAGMLDYAEFETFLAMAKCYKLLPGLLAIEADLIIGMTSPGVKHELVANIEV : 96
Ef NnaC : -----MFAFKSLIDMPGEGALAVVVALIIMAFKTIISLEMLPHMSIIIAIVLII : 49
He NnaD : -----MKTPTVYFA--ESLIGILLALIIIGYIIIGOKLTPHPIILVFMILLI : 47
Bf NnaC : -----MKKATVGF---LIIIGVMMATIIIASMFLVLEKVEPHPIVWCLIIA : 44
Vc NnaD : -----MITNHSPPHILRHSARWPGFLVLAIPILLFSPIAQAS-AGELDITSSLPEFIVATLEFLAAYLVMAEKKIMRKSQVLAAGLITAMIG : 90
Aanhad : -----MOSLRCVSWIAG-----LCLIFSTFVFAAS--AAPLDITSSLVGFVCAIFVVAAYLVIMGEKELHRKSKPVLAAGLITAMIG : 78
Vc NnaD : -----MGRIAL-----LSLIFSPISLASTPDGQALDHTSTIGYAAIIIPALAYTLVMLEEYDQRRKQVLLAAGLITAMIG : 75
Mg NnaD : -----MNASMI PFRVAVA-----ISLIFSPISLASTPDGQALDHTSTIGYAAIIIPALAYTLVMLEEYDQRRKQVLLAAGLITAMIG : 82
Nm NnaE : -----MRHLB-----LFSML PPAAYAA-----DIDGANILMLGIPRALIISIALGSLPFSHTHHHNGKITAFWTLLF : 67
Dv NnaE : -----MKRLSPALIAATISLILPAAFAFASGGHDDIDGSVLVANALPACMLISIAVMPILPHFWHHFGKVSALFNALF : 77
Mt NnaE : -----MFPYIGIKRIVSEKGOVENSIKRVAVLITLLCGSFLPBGVAAATG--NELGKMLPMSVLPKVMGLISIAIYVPLVNASWHEHNGKVSLEFMSLVE : 97
Rm NnaE : -----MNAPIHLAKFGSGLARMLGPVWCLMLPVAASALAOEAPAAEPATEVFAEHAHPDTSATVAHAEEAAHAADHGPBPVWVLPVYLLVMAIATGPLEYPHHWHHHPRYAWG--LGL : 117
B sp.NhaC : -----MEHIGMISLRSQCGVNI SDNKEGIYIILDCHLIGCFYCIILNDASNRGCFQVTSFFVSFETLIDQSPFAQVYES : 75

Ec NnaA : 0 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 * 2
P sp.NhaA : IAAVFFLLVGEVKEKREIMQSLA-----SLROAFVYIAAGMIVPALLYLAENYADPITREGWALPAADDIAFALGVTDLIGSRVPLAKFLMADAITDDI : 165
Vc NnaA : IAAVFFLLVGEVKEKREIMQSLA-----SLRQAAFVYIAAGMIVPALLYLAENYADPITRQGMALPAADDIAFALGVTDLIGSRVPLAKFLMADAITDDI : 139
Hp NnaA : IAAVFFLLIGLEVKREILLEGALK-----SRETAIPVIAAAGMIAAPALIVVAENFNDPALOGMALPAADDIAFALGVTDLIGSRVPLAKFLMADAITDDI : 173
Ec NnaB : ILLIMFVAGIYEMKQULLFIFTRILLSRSKMLISLSEFCVAAAFISAFDALIVAVAVISVAVGFEYGYHRYASR--TEDIDLODDSHIDKHVWLEQFRGLRSIMMHAAGVGTAL : 203
Kp NnaB : ILLIFVWAGIYEMKQULLFVETRLLIGRSKMLISLAFCLAAAFISAFDALIVAVAVISVAVGFEYGYHRYASAR--PDNDLDDSHTEOHRYEYLEQFRGLRSIMMHAAGVGTAL : 212
H1 NnaB : ILLIFVWAGIYEMKQULLFVETKLLVRSKMLISLAFCSAAAFISAFDALIVAVAVISVAVGFEYGYHRYASGNULIDAVDIDDRKTEIQQHELEKFRALRSIMMHAAGVGTAL : 221
Vc NnaB : ILLIFVWAGIYEMKQULLFVETKLLIGRSKMLISLAFCSAAAFISAFDALIVAVAVISVAVGFEYGYHRYASGNULIDAVDIDDRKTEIQQHELEKFRALRSIMMHAAGVGTAL : 215
Nm NnaC : IYGLARGLKINDMOQGMGTALINQMGALYIFFTGLMVSALMMSG--AIFPLMYYGFEHISPIYFYESSFALCSVIVSISSSLITCAYVGAEMGAAAFQADMAMTAGALVSGAF : 165
Ef NnaC : IYKMKKGFSEIHEGIVEGKIPGIPIIFIIIFLIGVAVATWISSG--TIPILMYYGFEHISPIYFYESSFALCSVIVSISSSLITCAYVGAEMGAAAFQADMAMTAGALVSGAF : 163
Bf NnaC : VEGRYLBRVGNMDESAMIDGKIGKIPITLALVGVITAVMMMSG--TVPITLIEYGLSISPEFVAVSTLIIICMIVSSFITSSFTVGTIGVAMMGTALGIDPALAAGAVVCGACF : 160
He NnaD : WY--YVAAGLDPASEEAFSTLIESEILFLIVAMTYINAMEERVRFDKRAMIVKESYSRSEFMITGILAFMIS--TIANNLITAMIMCAVAVIKVAEGDKRFTNLCINWVAASNA : 205
Aanhad : WY--YIRBDIDVTEAFRHNLEFAELMFLIVAMTYINALEERLFDALRAMIRKGSYQULFMITGILSFFIS--PIADNLTALLMCAVAVIKVAEGDKRFTNLCINWVAASNA : 193
Vc NnaD : WY--YOOTGSTEVARALEHLELVAEILFLIVAMTYISAMEERLFDALRAMIRKGSYQULFMITGILAFMIS--PIADNLTALLMCAVAVIKVAEGDKRFTNLCINWVAASNA : 190
Mg NnaD : WY--YKKEGMSDVAEALRBDVLDYGELELFLIVSIAVINAMEERVRFDKRAMIVKESYSRSEFMITGILAFMIS--SVSNMNTAMMCAVAVIKVAEGDKRFTNLCINWVAASNA : 197
Nm NnaE : IIPFSLVFGASGIHVAHRAIVVEEYIPELIIILALYITISGGII-----WGDINGTPEKNTALAVGTALASIMG--TTG--AAMMIRPLKAKONRIRRHVYIFETFLVANI : 173
Dv NnaE : IYPCAAVFGMGTALIVVHTFLLEVPELIIILRALFVYAGVR-----IKGSLVGTVPVNTALAVGTALASIMG--TTG--AAMMIRPLKAKONRIRRHVYIFETFLVANI : 183
Mt NnaE : FVPELILFQAGFAFDVAYVLLDYLPFIIILGFLVYAGGII-----LRGTRGNPQVNTALAVGTALASIMG--TTG--AAMMIRPLKAKONRIRRHVYIFETFLVANI : 203
Rm NnaE : FVSLYIFGFGS--TTPVVAHAEVLSFLTALVAVSLFVYAGGII-----INNAKGFPRNNALIIIFVSIYANMLIA--TTG--AAMMIRPLKAKONRIRRHVYIFETFLVANI : 220
B sp.NhaC : MTENGISINDMELYIMLFIYVFLGIYVSLTIFSGGGQAFSMAEKY---ITTRKGSIFLPEVLGVIIFIDYFNALIVGNTSRPLTRRYVSRAKLSYIVDSTSAPICVIAPMSWGAVY : 191

```


Ec Nhaa	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT	480	*	500	*	520	*	540	*	560	*	580	*
P sp. NhaA	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Vc NhaA	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Hp NhaA	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Ec NhaB	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Kp NhaB	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
H1 NhaB	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Vc NhaB	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Nm NhaB	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Ec NhaC	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Bf NhaC	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
He NhaD	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Aa NhaD	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Vc NhaD	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Mc NhaD	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Nm NhaE	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Dv NhaE	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Mc NhaE	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Rm NhaE	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
B sp. NhaC	: KPLGISIFCMTALRLKLAHHPGTT												
Ec NhaA	: V-----	600	*	620									
P sp. NhaA	: V-----												
Vc NhaA	: KA-----												
Hp NhaA	: ALKK-----												
Ec NhaB	: TEMFMGMWITL-----												
Kp NhaB	: TMLLAHGWTTPILP-----												
H1 NhaB	: TMLASIGLILPI-----												
Vc NhaB	: TEVFSLSGISHHVAPADALLOSGH-----												
Nm NhaC	: -----												
Ec NhaC	: GINVEL-----												
Bf NhaC	: KRG-----												
He NhaD	: SPALFH-----												
Aa NhaD	: LFHIYD-----												
Vc NhaD	: SFT-----												
Mc NhaD	: MF-----												
Nm NhaE	: L-----												
Dv NhaE	: -----												
Mc NhaE	: -----												
Rm NhaE	: PGIDAFFEOLLIR-----												
B sp. NhaC	: VFILQRYVSKKET-----												
Ec NhaA	: V-----	388	Ec, Escherichia coli, NhaA (NP_414560.1)										
P sp. NhaA	: V-----	362	P sp., Pseudomonas sp., NhaA (AAV49149.1)										
Vc NhaA	: KA-----	382	Vc, Vibrio cholerae, NhaA (O85187.1)										
Hp NhaA	: ALKK-----	438	Hp, Helicobacter pylori, NhaA (O26076.1)										
Ec NhaB	: TEMFMGMWITL-----	504	Ec, Escherichia coli, NhaB (AAA24218.1)										
Kp NhaB	: TMLLAHGWTTPILP-----	516	Kp, Klebsiella pneumoniae, NhaB (YP_002237820.1)										
H1 NhaB	: TMLASIGLILPI-----	522	H1, Haemophilus influenzae, NhaB (ZP_05848338.1)										
Vc NhaB	: TEVFSLSGISHHVAPADALLOSGH-----	530	Vc, Vibrio cholerae, NhaB (NhaB_VIBCH)										
Nm NhaC	: -----	-	Nm, Neisseria meningitidis, NhaC (NP_273581.1)										
Ec NhaC	: GINVEL-----	468	Ec, Enterococcus faecalis, NhaC (ZP_05501989.1)										
Bf NhaC	: KRG-----	462	Bf, Bacillus firmus, NhaC (AAc45432.1)										
He NhaD	: SPALFH-----	495	He, Halomonas elongate, NhaD (YP_003897392.1)										
Aa NhaD	: LFHIYD-----	483	Aa, Alkalimonas amylolytica, NhaD (AAx63482.1)										
Vc NhaD	: SFT-----	477	Vc, Vibrio cholerae, NhaD (AAg49354.2)										
Mc NhaD	: MF-----	481	Mc, Methylococcus capsulatus, NhaD (YP_114201.1)										
Nm NhaE	: L-----	473	Nm, Neisseria meningitidis, NhaE (NP_273614.1)										
Dv NhaE	: -----	-	Dv, Desulfovibrio vulgaris, NhaE (YP_009252.1)										
Mc NhaE	: -----	-	Mc, Moorella thermoacetica, NhaE (YP_423442.1)										
Rm NhaE	: PGIDAFFEOLLIR-----	527	Rm, Rhodothermus marinus, NhaE (AAy42129.1)										
B sp. NhaC	: VFILQRYVSKKET-----	535	B sp., Bacillus sp., NhaC (ABH03020.1)										

Anexo 2- Alinhamento de seqüências de 50 proteínas com elevada similaridade com o NmNhaE e por isso considerados hipotéticos antiporters a usar o NmNhaE como *query*. A asiaticus, Amoebophilus asiaticus (YP_001958297.1); A sp1., Algoriphagus sp. (ZP_01718340.1); A sp2., Anaeromyxobacter sp. (YP_001380997.1); A vinelandii, Azotobacter vinelandii (YP_002798245.1); B Ellin514, bacterium Ellin 514 (ZP_03629791.1); B japonicum, Bradyrhizobium japonicum (NP_773762.1); B phymatum, Burkholderia phymatum (YP_001857045.1); B sp., Burkholderia sp.(YP_368456.1); C eutactus, Coprococcus eutactus(ZP_02207858.1); C flavus, Chthoniobacter flavus(ZP_03133069.1); C testosteroni, Comamonas testosteroni (ZP_03544348.1); C limicola, Chlorobium limicola (YP_001942426.1); C phaeobacte, Chlorobium phaeobacteroides (YP_001960386.1); C tepidum, Chlorobium tepidum (NP_661198.1); D acidovorans, Delftia acidovorans (YP_001565753.1); D baculatum, Desulfomicrobium baculatum (YP_003159209.1); D hafniense, Desulfitobacterium hafniense (YP_520285.1); D sp., Diaphorobacter sp.(YP_002552833.1); D vulgaris, Desulfovibrio vulgaris (YP_009252.1); E corrodens, Eikenella corrodens (ZP_03713713.1); E hallii, Eubacterium hallii (ZP_03715974.1); H arsenic, Herminiimonas arsenicoxydans (YP_001099123.1); K oralis, Kingella oralis (ZP_04602428.1); L cholodnii, Leptothrix cholodnii(YP_001791022.1); L hongkongens, Laribacter hongkongensis (YP_002795798.1); L intracell, Lawsonia intracellularis (YP_594890.1); L nitroferrum, Lutiella nitroferrum (ZP_03697702.1 and ZP_03699435.1); J sp.,Janthinobacterium sp. (YP_001352410.1); Nm, Neisseria meningitidis (NP_273614.1); M loti, Mesorhizobium loti (NP_105654.1); M petroleiph, Methylibium petroleiphilum (YP_001020707.1); M silvestris, Methylocella silvestris (YP_002362098.1); M thermoacetica, Moorella thermoacetica (YP_429442.1); O carboxido, Oligotropha carboxidovorans (YP_002290536.1); P aestuarii, Prosthecochloris aestuarii (YP_002016448.1); P phaeoc, Pelodictyon phaeoclathratiforme (YP_002017089.1); P naphthalen, Polaromonas naphthalenivorans (YP_981856.1); T intermédia, Thiomonas intermédia (ZP_05500427.1); R centenum, Rhodospirillum centenum (YP_002297310.1); R eutropha, Ralstonia eutropha (YP_727038.1); R intestinalis, Roseburia intestinalis (ZP_04745272.1); R marinus, Rhodothermus marinus, (AAY42129.1); R palustris, Rhodopseudomonas palustris (ZP_06360325.1); R sp., Ruminococcus sp. (ZP_04857516.1); S fumaroxidan, Syntrophobacter fumaroxidans (YP_845285.1); V eiseniae, Verminephrobacter eiseniae (YP_996836.1); V paradoxus, Variovorax paradoxus (YP_002943689.1); V spinosum, Verrucomicrobium spinosum (ZP_02926838.1); X autotrophi, Xanthobacter autotrophicus (YP_001416350.1)

NmNhaE	: -----MRH-----LPLFS-LMLFPASVYAA---	: 19
D vulgaris	: -----MKRLSP---ALTAAT-----LSLLLAPIAAFASGG-	: 27
D baculatum	: -----MRKSSVWFCLAVMG-----LGVLGMSLEVWAAG-	: 30
L intracell	: -----MKLFHVLFLVLTIL-----FFIPFSVLAATG-	: 26
E corrodens	: -----MRIR-----TALFLPLLALPLPALAG---	: 21
K oralis	: -----MKP-----IQIISPLLALIPALAQAA-	: 22
A vinelandii	: -----MKS-----ILRRLPYLLALSPGLSFPA-	: 22
L nitroferrum	: -----MTR-----KLLAS-ALLSLLPALAQAA-	: 21
L hongkongens	: -----MIR-----RSLLAALPLGLMPMLAQAA-	: 22
J sp.	: -----MASPQYGVPMRAN-----FIVGMLALS---	: 29
H arsénic	: -----MRAN-----IFVGMALALT---PALCGAA-	: 20
R eutropha	: -----MRRAS-----VLLPLLAVLAAFPAAAGHAA-	: 24
B sp.	: -----MKRHAAWAGMAS-----GIALGAV---PALASAA-	: 26
B phymatum	: -----MQGCFVRTLCSTQRIVSS---SMGALALWLVTWPSAASAA-	: 40
D acidovorans	: -----MKALRGL-----LVLLVACVPSWALAA-	: 22
C testosteroni	: -----MKAAAA-----FLTAVGA---ARAA-	: 19
P naphthalen	: -----MRNLDLSMRIFRWLG-----ACALLSLWPGLSFPA-	: 30
D sp.	: -----MNPRTL-----ALGLLCLAPALAGAA-	: 22
V eiseniae	: -----MTPRGL-----VAVFLALLPDMGMAA-	: 23
V paradoxus	: -----MKKTIRLAA-----AAALPMMFPALAMAA-	: 24
L cholodnii	: -----MSKAPLRALGLG-----LAALL--LPIAAQAA-	: 25
M petroleiph	: -----MLTVALHPRAARW-----HFILLALVGCLEPTVAGAA-	: 32
T intermedia	: -----MRCETR-----AAATVLLSLLPGLASAA-	: 23
R palustris	: -----MFERRP-GRCGLLLP-----LLLLLSPCPAQAA-	: 27
B japonicum	: -----MLSVRLKQOSASLLPRRLVML---RGDLSVAAILALLPQAWAAM-	: 42
M silvestris	: -----MIGSKRGTALAVVA-----AGLIASPAAAAE-	: 27
O carboxido	: -----MTISRRLILTLLAIC-----LPSPAFAS-	: 23
M loti	: -----MAGS-AIAFAMLPD-----AAVAEEH-	: 22
X autotrophic	: -----MAARRRGMKFGLRSAA-----AFALPFLALLLTAAS-	: 31
L nitroferrum	: -----MLS---LLF-RRGAL-----AWLLGTLPPLVAHAG-	: 25
R centenum	: -----MTARPPDTRSTALRLLKT-----LTLAFALPLVSVLPAQAEEGA-	: 40
D hafniense	: -----MEHS-----	: 4
S fumaroxidans	: -----MHRGERLTFIFSLISL-----SLCLAGTASPALASGP-	: 32
R intestinalis	: -----MK-KLFAL-----CGSIATMLLFTPLTILAES-	: 27
R sp.	: -----MK-KLVTV-----LGAFFAVLLACPLSVFAAE-	: 26
E hallii	: -----MK-KLLIG-----LSAFLFS---PLHVFAES-	: 24
C eutactus	: -----MKNKFLG-----LGTFFISLIGLSQINVLASS-	: 28
M thermoacetica	: -----MFFYIGIGPKIVFSEKQVEMSIKRVAVLTLCLCGSFLPLGGVAV-	: 45
A sp2	: -----MVTCCGAMPRLVAS-----LAAFALALVAAPGAALAS-	: 32
C phaeobacte	: -----MKD-TFLRALFCVIVLFMIGGACGGVLHASETAALSH--AA-	: 39
P aestuarii	: -----MKK-SLLYMFCMAVVAVLMVSGFSGVLYASEAAEAVHAAVA-	: 41
P phaeoc	: -----MKP---TKRSLLFFACMFVSVGLSGALYAEALDITAVAPAL-	: 39
C limicola	: -----MLLRPRTVDKKTVVFFLFTVSG-----SSMLSAAIGQDAP-	: 37
C tepidum	: -----MTCCSDFLKRSAAAATTLIFSLTVPSVAFASGG-	: 35
R marinus	: MNAPHLKAFGSLARMLGPLVVCLWLLPVASALAQEAPAAEAPATEAVEAEHAPDTSATVAHAAEE-	: 65
A spl	: -----MSFAEE---RETKETFLAQAGQDTNAEHADVEHS--	: 31
A asiaticus	: -----MFRNIAISALWIFILMAGVKSNTIYALADESLSHSANHNLCCKGVIEERTKHTPVLCSNI-	: 59
B Ellin514	: -----MPTEQPG-----	: 7
C flavus	: -----MMSLGSATI-----	: 9
V spinosum	: -----MTPLFSSASSAAHTT-----	: 15

NmNhaE	:	IPFSLVFGASAGIHTVAHALVEEYTFEFLILLALYTTISGGILVWGDNLGTPKLNNTALLAVGTALA	:	133
D vulgaris	:	VPCAAVFGMQTAIYQVLHTFLEEYVEFLILLFALEFVWAGGVRLKGSVGTVPVNTALLAVGTLLA	:	143
D baculatum	:	VPYALVYGFDLAVYNVHLVFLFLEYTSFIILLFSLFTIAGGVCLRGSVGVQVNVVILLIGTLLA	:	149
L intracell	:	IPCAYIFGIPLTAYQLLHTIFLEYTFEFLIVLLVLFVWAGGVRLKGLHIGKPIVNTGLLFIGTILA	:	142
E corrodens	:	IPFTLVYGFSTSLHVLVHALVAEYTFEFLILLWALYTTISGGILVWGNLHGSPRMNTALLAIGTLLA	:	135
K oralis	:	IPFTLTFGTHQSLHLIAHAMTGEYTFEFLILLALYTTISGGILVWGNLHGSAKLNNTALLAIGTALA	:	136
A vinelandii	:	VPFAFAFGPHDTFAVIVHALFAEYTFEFLIVLLFSLYTTISGGILVWGNLHGSPRLNTLLAIGVALA	:	136
L nitroferum	:	LPFTLAFGPGSMASLVVHALLAEYTFEFLIVLLTLYTVSGGILLWGNLHGSPRLNTALLAAGTLLA	:	135
L hongkongens	:	VPAALIYGTGTAAGVHVHALVDEYTFEFLIVLLFSLYTVSGGILLISGNLHGSPKLNTGILLALGTVCA	:	136
J sp.	:	LPCAYFFGASTAVHGAVHAFVAEFLPFLLIITSLEFVWAGGICVVRGNLHGTPALNTGLLAIGTVLA	:	143
H arsenic	:	LPCAIYFGAATAVHGAVHAFVAEFFFLLMLITSLEFVWAGGICVVRGNLHGTPALNTGLLAIGTVLA	:	134
R eutropha	:	LPFAAAFVGHAAAASAGHALLAEYTFEFLIVLLASLYTVAGGICVVRGNLHGTPALNTGILLALGTLLA	:	138
B sp.	:	IPFAFAFGAGTAFGLTVHALLEEYTFEFLIVLLTALYTVAGGICVVRGNLHGTPKLNNTALLALGTLLA	:	140
B phymatum	:	IPYAFAFGAAAAGFTLIHALLEEYVFEFLIVLLTALYTVVGGICVVRGNLHGSPRLNAALLALGTALA	:	154
D acidovorans	:	LPFAAVFGAALVNLVHALLAEYTFEFLIVLLTALYTVSGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGVALA	:	136
C testosteroni	:	LPFALVYGPAGMNLVHALLAEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGALLA	:	133
P naphthalen	:	LPFALIYGPMAAFSFLHALLEEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	144
D sp.	:	VPFVAVFGPVAAAGFAHALVAEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGSPALNAGFLAVGAVLA	:	136
V arseniae	:	LPFALCFGPAAGTSLVHALLAEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	137
V paradoxus	:	LPFAAIHGAPLAGSQFVHALVEEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGAPLNNTALLAIGAVLA	:	138
L cholodnii	:	LPFAFFYGPAMAGQGFVHALLAEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	139
M petroleiph	:	LPGALFGAGAAAALVHALLAEYTFEFLIVLLTALYTVAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	146
T intermedia	:	IPFAISFGVQATWSAALHTLLEEYTFEFLIVLLTALYTVSGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	141
R palustris	:	APIAVVYQWQSALASLVHALLAEYTFEFLIVLLFALEFVWAGGILVVTGTRATPLNTGLLAVGTACA	:	141
B japonicum	:	GSLVWLAGGMATLALVHALLAEYTFEFLIVLLFSLYTVAGGILITGDIRGTPAANAGILLALGTLLA	:	156
M silvestris	:	GGLIAIVGLDATAAAAFVHMALEEYTFEFLIVLLFALEFTAAGGIAIDSAIKATPAINCAILAIGSVCA	:	141
O carboxido	:	IPFLAVDAPTPTSALAHTAFLLEEYTFEFLIVLLFALEFVWAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	137
M loti	:	VPLALAFGIPQATEAVLHALLTEYMSFIILLFALEFVWAGGILVAGNIHGTPLVNAGLLLVGALFA	:	136
X autotrophic	:	VPFATVYGPSATGHEVVHTALLEYTFEFLIVLLFALEFVWAGGILVVTGNIKGSPAVNTLILGIGTLLA	:	154
L nitroferum	:	VPFALQHGSGATGHELLHTLLEEYTFEFLIVLLFALEFVWAGGILYVRGNLHGSPALNTALLAIGAVLA	:	138
R centenum	:	IPFAAVEGIDIAGYELLHTLLEEYTFEFLIVLLFALEFVWAGGILVSGNLIGTPNNTALLAIGAVLA	:	165
D hafniense	:	VPLIVVYQ-KQGVDELHLLIADYTFEFLIVLLGSLFVWAGGILVVRTSLKGTWVNVAGFLTIGAVLA	:	115
S fumaroxidans	:	IPMVAAYG-GTAGFEFYHVMADYVFEFLIVLLWALFVWAGGILLRGTLRGTPAVNSFMLLIGTVLA	:	150
R intestinalis	:	IPFAVYTSAGDAVETVLECIINDYTFEFLIVLLFGLFCVAGNITLEGDLGSPRVNVIFLAIGTLLS	:	142
R sp.	:	VPFVAVYAGKTAETVLDICINDYTFEFLIVLLFGLFCVAGNITMEGDFAGSPRVNVGLLALGTLLS	:	141
E hallii	:	IPFAIAFGGHVALEHLEVTLDYTFEFLIVLLFGLFCVAGNITLQGDLAGNPKVNVVLLIGTLLS	:	142
C eutactus	:	IPFAIFHGFGTMGEQLLEVMIGDYTFEFLIVLLFALEFVWAGGILLEGDLGTPKLNNTALLAIGTLLS	:	146
M thermoacetica	:	VPFLIAFGSGTAFTQAVEVYLLDYTFEFLIVLLFGLFVWAGGILLRGTLRGNPVNVVLLLVGTLLS	:	163
A sp2	:	LGIPIVIAWIATHDHTVVLHTLHEEYVAFILLVGALEFVWAGGILVLRGTLGTPGLNAALLAVGAVLA	:	145
C phaeobacte	:	VALYGFGLMDHGTHVLLHT-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILIKIGTRGRPVVNGALLFVVGALLA	:	156
P aestuarii	:	VAGFYGFMDHGTHALLHT-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILIKIEQRGRPAVNAVLLFVVGALLA	:	158
P phaeoc	:	VACYYGLMDGGWHVLEHT-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILIRIERKGTPLMNALLFFGAIIS	:	152
C limicola	:	VAVYGFELMEHGQHALTHT-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILIRIERRQPIVNVGLLLFVVGAVLS	:	150
C tepidum	:	VALWYAFMAEHGGHMLLHT-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILIKIERRGTPLLNALLLVFVVGAVLA	:	146
R marinus	:	VSLYYIFGLGS-TTPVVA-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILYININAKGTPRNNALLLVFVVGAVLA	:	181
A sp1	:	VVFFYLFVLEN-VHNPVVA-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILIEIDKKATPFANVSVLLIGSVIA	:	147
A asiaticus	:	VISYYLFVLEN-VHNPVVA-LEEYTSFIALLSFLFVWAGGILINVNKTATPIVNVLLVIGAVLA	:	175
B Ellin514	:	TATYYIFFIHS-GARILHV-AHEYTSFIALLSFLFVWAGGILIRVKGEAKPWVNCVFLVIGAVLA	:	113
C flavus	:	TVLYYLLGLHA-WGRLAGI-AGEYTSFIALLSFLFVWAGGILVVRTRGEAVPSINALYLLAGAVLA	:	115
V spinosum	:	TAAYYLFGLHH-GAAVLHS-EMEYTSFIALLSFLFVWAGGILIRVKGEATPFVNTVFLVIGAVLA	:	121

NmNhaE : SIMCTTGAAAMLIRPILKANQRTRRVHIVFFIILVANI GGGLT PLGDPPLFLGFLKGVDFMWT : 198
 D vulgaris : SWMCTTGAAAMLIRPILLRANSHRRFRVHSVVFIIILVANI GGSLT PLGDPPLFLGFLKGVSF FWT : 208
 D baculatum : SWMCTTGAAAMLIRPILMRAIAHRKYVHTIVFFIILVANI GGSLT PLGDPPLFLGFLKGVSF FWT : 214
 L intracell : SWMCTTGAAAMLIRPILIRANEHRKYVHSVVFIIILVANI GGSLT PLGDPPLFLGFLKGVH FFWT : 207
 E corrodens : SVMCTTGAAAMLIRPILKANDNRRKHVHVVFIIILVANI GGGLT PLGDPPLFLGFLKGVDFLWT : 200
 K oralis : SVMCTTGAAAMLIRPILKANDNRRKHNVHVVFIIILVANI GGGLT PLGDPPLFLGFLKGVDFGWT : 201
 A vinelandii : SLMCTTGAAAMLIRPILLRANDNRKRVHVVFIIILVANI GGGLT PLGDPPLFLGFLKGVGF FWT : 201
 L nitroferum : SVMCTTGAAAMLIRPILKANDNRRHNVHVVFIIILVANI GGGLT PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 200
 L hongkongens : SLMCTTGAAAMLIRPILLRANDNRKHNHVHVVFIIILVANI GGGLT PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 201
 J sp. : SFMCTTGAAAMLIRPILIRANDNRKHGAHVVFIIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 208
 H arsenic : SFMCTTGAAAMLIRPILIRANDNRKHAHVVFIIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 199
 R eutropha : SFMCTTGAAAMLIRPILLRANDNRHVAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 203
 B sp. : SVMCTTGAAAMLIRPILLRANDNRKHVVHVVFIIILVANI GGSL S PLGDPPLFLGFLNGV S FFWT : 205
 B phymatum : SIMCTTGAAAMLIRPILLRANDNRHVVHVVFIIILVANI GGSL S PLGDPPLFLGFLNGV S FFWT : 219
 D acidovorans : SFMCTTGASMLIRPILLRANDNRKHVAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 201
 C testosteroni : SFMCTTGASMLIRPILLRANDNRHQAHVVFIIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 198
 P naphthalen : SFMCTTGASMLIRPILIRANDNRKAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 209
 D sp. : SFMCTTGASMLIRPILIRANDNRKVAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 201
 V eisensiae : SFMCTTGASMLIRPILLRANDNRKHVAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 202
 V paradoxus : SLMCTTGASMLIRPILIRANDNRVSKAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 203
 L cholodnii : SFMCTTGASMLMVRPILIRANDNRKHAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 204
 M petroleiph : SFMCTTGASMLIRPILIRANDNRHAAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 211
 T intermedia : SVMCTTGAAMLMVRPILIRANDNRKHVAHVVFIIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 206
 R palustris : SLICTTGAAMLVRLIRANAGRNRHNVHMVFIIILVANI GGAL S PLGDPPLFVGF LRGIDFFW P : 206
 B japonicum : SVVCTTGAAMLIRPILIRANRPRRRAHVVFIIILVANI GGAL S PLGDPPLFVGF LRGVDF FWT : 221
 M silvestris : SLICTTGASMLVRLIRANAGRPNVAHVVFIIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLHGVDF FWT : 206
 O carboxido : SIVCTTGAAMLIRPILIRANQRKQYNAHVVFIIILVANI GGAL S PLGDPPLFLGFLKGVDF FWT : 202
 M loti : SVICTTGASMLIRPILIRANDARPNAHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFVGF LRGVDF FWT : 201
 X autotrophic : SLICTTGASMLIRPILLRANDERRHNVHTVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGVNF FWT : 219
 L nitroferum : SFTCTTGASMLIRPILLRANDNRKHTHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGV S FWT : 203
 R centenum : SLVCTTGASMLIRPILLRANQRKTKVHVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFVGF LRGVDF FWT : 230
 D hafniense : SWMCTTGAAAMLIRPILRVNKRKYKAFMVVFIIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLHGV P FFWT : 180
 S fumaroxidan : SWMCTTGAAAMLIRPILRANRRNRSMVVFIIILVANI GGCL T PLGDPPLFLGFLHGV P FFWT : 215
 R intestinalis : SCICTTGASMLMVRPVIKMNWRQKSHIMVFIIILVANI GGCL T PLGDPPLMGFMRGV P FFWT : 207
 R sp. : SCICTTGASMLMVRPVIKMNWRKRGHIMVFIIILVANI GGCL T PLGDPPLMGFMRGV P FFWT : 206
 E hallii : SWICTTGASMLIRPILIRANKWRQKQIMVFIIILVANI GGCL T PVGDPPLMGFMRGV P FFWT : 207
 C eutactus : SWICTTGASMLIRPILIRANKWRQKQIMVFIIILVANI GGCL T PVGDPPLMGFMRGV P FFWT : 211
 M thermoacetica : SWICTTGASMLIRPILIRANWRRYKAHIIIFIIILVANI GGAL T PVGDPPLFLGFLRGV P FFWT : 228
 A sp2 : SIVCTTGASMLIRPILLRANSVRKRVAVHVVFIIILVANI GGGL T PLGDPPLFLGFLRGV P FFWT : 210
 C phaeobacte : DVICTTGASMLIRPILRINEGR-LKPFHIVFFIILVANI GGGL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 220
 P aestuarii : DIICTTGASMLIRPILRINEGR-LKPFHIVFFIILVANI GGGL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 222
 P phaeoc : NLVCTTGASMLIRPILRINKGR-LKPFHIVFFIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 216
 C limicola : NLICTTGASMLIRPILRINEGR-LKAFHIVFFIILVANI GGGL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 214
 C tepidum : NVVCTTGASMLIRPILRVNKR-LKPFHIVFFIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLRGV P FFWT : 210
 R marinus : NLIATTGAAMLEVRSYMRLNKG-LKPYHLIFIIILVANI GGGL T PLGDPPLFLGFLRGV P FFWT : 245
 A sp1 : NLICTTGASMLIRPILIRLNKGN-IQAYHIIFFIILVANI GGSL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 211
 A asiaticus : NFICTTGASMLIRPILIRLNQDR-IKTYHIVFFIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 239
 B Ellin514 : NFICTTGASMLIRPILIRMNKYR-ITAFHIVFFIILVANI GGCL T PLGDPPLFMGYLKG V P FFWT : 177
 C flavus : NLICTTGASMLIRPILIRMNKYR-FTMYHTAFFIILVANI GGCL T PLGDPPLFLGFLKGV P FFWT : 179
 V spinosum : NLICTTGASMLIRPILIRMNKYR-ITKFHIVFFIILVANI GGAL T PLGDPPLFLGFLRGV P FFWT : 185

NmNhaE	: VKHMFAPVLISTAVLITAFVFLDNRFKQ-----ESIAQDTPAQQE-----	: 239
D vulgaris	: TSHLLMKTILVSVLITAAFFVLDTVLNFRE-----GRPVPNAESG-----	: 249
D baculatum	: TVHMFVPPFAVISTITLALYFAIDTVLNFKE-----GRPESPDAGQD-----	: 255
L intracell	: TTHLFPMTVILSILITTIYFILLDSILYKKE-----GSPLPQNISDNP-----	: 249
E corrodens	: VQHMLPPLVLISSAAVLLTVFYLLDSKYFAQA-----DEILAKDPSPDS-----	: 242
K oralis	: VVHMFPPVLISTIYLLTVFYLLDSRYFARA-----DEILPKDPTPDSHFQAAF-----	: 249
A vinelandii	: VEHMLLPVLLSSAALLTVFYLLDRYFYARE-----DELLPRDPSPDS-----	: 243
L nitroferum	: VRHMLPVLAAALALLAVFYLLDSYFYRKE-----G-VLPRDPSPDT-----	: 241
L hongkongens	: LEHMLPVMASVLLVLFYLLDSYFYRKE-----N-IEPADPTPDT-----	: 242
J sp.	: VRHMFAPTLFICVALLIIFVYLLDSHYHHR-----EEVKPELDP-----T	: 249
H arsenic	: VRHMFAPTLFICVALLIIFVYLLDSHYHHR-----EEIKPPEQDP-----T	: 240
R eutropha	: MRNMFAPTLFICVLLVLFYLLDRHYHQR-----EEELPPRSDP-----T	: 244
B sp.	: TTHLALPMLFICVLLTLFVLLDTYFYRKG-----GEERPAVLDP-----T	: 246
B phymatum	: TLHLALPMLFICGVLLAVFYLLDSYFYRHR-----EEVLP--VDP-----S	: 258
D acidovorans	: VRHMFAPTLFVGVLLALFYLLDRWFLRKA-----GEADLPDPTPSID-----AS	: 246
C testosteroni	: VSHIWGPMFLTLALLAVFYLLDRHLMGHK-----GETDLPDPTPSMD-----AT	: 243
P naphthalen	: ASHMFAPTLFVGVLLALFYLLDAWFYHRR-----EELMPLDPTP-----D	: 250
D sp.	: AAHMFAPTLFVGVLLALFYLLDSWYRQA-----GELGAADPTP-----D	: 242
V eiseniae	: ARHMFAPTLFVGVLLALFYLLDRWFLRKA-----EELLPADPTP-----D	: 243
V paradoxus	: ARNMLPNTLFLVGMLLALFYLLDRHLYRKE-----G-VLPFDPTP-----D	: 243
L cholodnii	: LSHMFAPTLFVGVLLALFYLLDRWFLRKA-----G-VVRADPTP-----D	: 244
M petroleiph	: VKHMFAPTLFVGVLLALFYLLDRHYHVR-----G-VCPVDPTP-----D	: 251
T intermedia	: LKHLVPTALLCALAVFYLLDRWFLRKA-----AERPAIDPTPDS-----	: 248
R palustris	: VQHLWQQTLLIVAGILLTIFVLLDLWYARH-----DPP-AET-----	: 241
B japonicum	: TRNMLPQTTIVAGLLVIFVAVDVWRERS-----EPPPGDTG-----	: 258
M silvestris	: AKHMLPETFVAVSALLAAFFVVDVSYFLRQ-----ETPDAGPR-----	: 243
O carboxido	: QHMLWLETITGGVLLAVFYLLDRWFLRKA-----GRARK-KDPT-----	: 241
M loti	: TANLWRETLLFVGGVLLAVFLAIDIIILHRR-----AGAPKIKDPT-----	: 241
X autotrophic	: TTHLHLDTAVIAAILLVAYVLLDRYFYAKE-----DPALKRTDPTPP-----	: 261
L nitroferum	: LRHMLPMLAFASVALLVLFYLLDRHYHHR-----ENLPLADPTP-----	: 244
R centenum	: VEHMFAPMLMSVLLAVFYLLDSIAWRRE-----GLPMPEEESR-----	: 270
D hafniense	: LR-LITPMVAVLAGLLMYIAFDKYLLAKEQKEAGLALASSAGDRAVAATQNIANEG-----S	: 237
S fumaroxidans	: FN-LLEPMLVVAIVLGMVFLDFYMYKKE-----GVTPPVEEDA-----K	: 255
R intestinalis	: LH-LFPVLLFNMVILLTVFYLLDRHNYRKD-----IANGRKPDISKAGT-----	: 250
R sp.	: LH-LFPVLLFNMVILLFVYQIDKRSYRKD-----IANGRKPDIRKPGT-----	: 249
E hallii	: LH-LFPVLLINVIILLTVFYLLDRHNYRKD-----IAAGFRPEMKTENR-----	: 251
C eutactus	: LR-LAKVMGVNLIILLTVFYLLDRHNYRKD-----IADGRVQPVFDKDTK-----	: 255
M thermoacetica	: MR-LILPMGFNVLLITLYFLLDSYFYRKE-----KVP-----RAKGGQ-----	: 266
A sp2	: MR-LWLEWLFVNGALLAVFYVVDSTIERKE-----DIATPGDLDEQA-----E	: 252
C phaeobacte	: LSEIWHIWLITVIVLLGVFMIFDTIAGKGI-----VPKDFGSET-----	: 259
P aestuarii	: LKETWPIWLATVLLALIGVFMVLDKAGKGT-----VPEELKGGT-----	: 261
P phaeoc	: LPKVWLPWLLITVAGLLIFVILLDKVGRGT-----GDMKGAEV-----	: 252
C limicola	: LSKVWLPWTVTIAGVALLFVLLDAKAGD-----PVKSAGEQ-----	: 250
C tepidum	: IQHLWLPWLLVTIGLLTAIFVLLDLKAGK-----NEAEQY-----	: 245
R marinus	: LTHVWFVWLLPTVLLIILAVFYVLDARNKIE-----SPDPDPS-----	: 281
A sp1	: LEHMLPAPVVALIILAVAFVFLDKKLGKAS-----EDEIELEETIY-----	: 252
A asiaticus	: LQHNLLPWLAILMLSLIFVLLDNRNVVNG-----KKNIVLSKS-----	: 278
B Ellin514	: LQNAWAAWLLIGMLALLGIFVALLDRANFLRA-----PKEVDRREIP-----	: 217
C flavus	: TLKCLPAWGLAVACTVAAFYVLDNRNVLAA-----PRAIREQQTAA-----	: 219
V spinosum	: IQHVWTTWLLWAMALLGVFVLLDKKNEARA-----PKEVAAKEAA-----	: 225

NmNhaE : -KPEKTAIFGKWNFLLLSGVVAVLMSGLWKPPEHPGFEILG-----SRYALQNLV : 288
D vulgaris : ---EKLGLDGVVNLPLLGGVVALVMSGLWKPPE-VAFNVYG-----IEVELQNLA : 295
D baculatum : ---GKLRLEGTANLLLAGVGGVLMMSGMWKPG-VEITVYE-----VHVELQNIL : 301
L intracell : ---GQLGIEGKVNLLLLCIVLTVLMSGVWNPD-ISINITYG-----ISIALQDLS : 295
E corrodens : -PPEKTKLMGKWNFLLLGGVVAAVMMSGIWKPAHPGLEIFG-----THYALQNLA : 291
K oralis : PAVDGIKIYCKINFLLLAGVIGAVLLSGLWKPESHGFEILG-----AHLEPQNMA : 299
A vinelandii : ----PLRLYGSVNFLLLGGVIGAVLLSGIWKPG-VAFTVMG-----TPIEWQNLN : 288
L nitroferum : ----PKLYGQFNFLIAGVGGVAVLLSGLWKP-LSIDVLG-----TPLELQNAV : 286
L hongkongens : ----PFRIFGSFNFLIAGVVAAVLMSGLWKP-IQFEILG-----AKWQLQNV : 287
J sp. : PDS-ALRFECKINFVLLGIIVAVLMSGFWKPG-ISYVAVG-----NTVELQNL : 297
H arsenic : PDS-ALRFECKINFVLLGIIVAVLMSGFWKPG-IAYSFFG-----NTVELQNL : 288
R eutropha : PDSGGIAIECKNFVLLLAIVGLVMSGLWQPG-IAFDVLG-----TEVPLQAAV : 293
B sp. : PDNDRISIDCKINFVLLVAIVGLVMSGVWKPG-ITFDVWG-----THVALQNLV : 295
B phymatum : PDTRTLGAIKVNFLVLLVIALVMSGIWKPG-ITFDVAG-----THIELQNV : 307
D acidovorans : GRASRLGFDGSVNFALLLAIVAVLMSGLWKP-AGLVLG-----THVGLPGLV : 295
C testosteroni : GARSRLGFEGRVNFVLLMVVAVLVSGIWRTP-AGFEIAG-----THVSLPGLV : 292
P naphthalen : TR--SIGFDCAANFVLLAAVAGLVLLSGIWKSA-VVFNIAG-----TDIGLPGLV : 297
D sp. : SAPAALGFDCKINFVLLLAIVGLVLLSGIWKSP-VEWVIAG-----TPLGLPGLV : 291
V eiseniae : DR--ATGFDCKANFALLGLVAVLMSGIWKSP-LSWHIAG-----AQVGLPGLV : 290
V paradoxus : TR--RVGFDCAANFVLLGGIVFFVLLSGVWKSP-VGFEVFG-----THVGLPGLV : 290
L cholodnii : DH--SFGIEGHINGLLLGVALVMSGTWKPG-ISFDIAG-----TPVGLQV : 291
M petroleiph : TP--GFAIEKVNLLLLGVVAVLMSGTWQPG-IEFAVFG-----TPVGLPGLV : 298
T intermedia : ----PLGIIICAWNVLVLLVAVLMSGLWKP-ITVTILG-----QSLDLQNL : 293
R palustris : -AEQPVGFRCSINFVLLIAGIIGTILACSQRSG-IAFNVYG-----TRVALENLV : 289
B japonicum : -PLKPVRIKLVNLLVIAIVASLISAMWKPG-IAFDILG-----TRLELEDIA : 306
M silvestris : -PPFAVKASGLVNVGLIAIAICAVLSGLWRPG-LGVDVVG-----TRIELQNV : 291
O carboxido : -PDSPLKLGKINLLLVAVIAALMSAKWKPG-IAFNVAG-----AELELQDL : 289
M loti : -PDSKVRIRGLPNIPLLAGVIGAILLSATWKPG-VSFSIQG-----VTLELQNLV : 289
X autotrophic : --TEKIGLRCAQNLPLVGIIGAILLSALWKPG-VTFDIYG-----THVELQWIV : 308
L nitroferum : --DSKLRLECSINLLLAGVIGAVLLSGTWKPG-INWTIGG-----LEIELQSV : 291
R centenum : ----QIRIQGHNIIYLAGVGGVLTGPEPE-WSLHIWH-----LSFPLDSL : 315
D hafniense : APEKLEILCAQNFILLAAIIGVILFSGYVKMS--EVSILG-----VHLGWQDVI : 285
S fumaroxidan : EP---IRLDGSLNLELAGVIGAVLMSGLADWG--SVDIFG-----AHCTVADMV : 300
R intestinalis : ----TKIDGLHNIIFLIMVAAVILSGTLPNLAQDAAG-NVRGIRVFRE---VTLGFPSII : 306
R sp. : ----QFRLDGLHNIIFLVMVIGAVILSGVLPGMSAFQDAAG-NVRGIHLFGE---VTLTFPALI : 305
E hallii : ---VKLHLDCAHNIIFLLIIVAGVILSGVLP--TTFPVFS---EGLTIMG---VTLASYASII : 302
C eutactus : ---KPVRLKCAHNIIFLVMVIGAVILSGVLP--MKFPVFA---KGINFCEG---VTLASWASII : 307
M thermoacetica : ---DPLRVEGLQNLIIYLGIVGAVILSGILAKNPAFADQQTGNLYGITIFRHGEEAVVLPYTNII : 328
A sp2 : AHKVPLSIAQRNLNLYLAGVGGVLLAAGSLRPL-----AG-----V : 288
C phaeobacte : --DKKFEIQGSRSFIFLAVIIVAVFLDPAVISGFPSLQKMF-----HVPFGI : 304
P aestuarii : --GGVKIVGSRNLELIVIIISVFLDPAVIAGFPSLQDMF-----HVPFGI : 306
P phaeoc : --NGGVSITGRRNLELAVIIVAVFLDPAVIEGIPSLQKLF-----HLPFGI : 297
C limicola : --GGIRITGKNFYLAIVILAVFLDPAVISGFPSLQKLF-----HLPFGI : 295
C tepidum : --SGRITLIGRRNLYLIIPLIGSIFLDPAVIPGFPSLQEIF-----HVPFGI : 290
R marinus : --QPLVQIRCAKNFLVLLVILSVFLDPNVFEWVPLHELY-----HLPFGI : 326
A sp1 : --TNKFSLIGMKNFGWLFIIICSVFLDPNVIDGVPVAVYDG-----QKFSYL : 297
A asiaticus : --SRAIEIVCKRNFLVLLVILAVFDPNIFDWPVPAIHYHG-----HDFSIV : 323
B Ellin514 : --LETWNITGWRNVAVLVVILVAVFLKH-----PPGV : 247
C flavus : --HEEFKIEGLANLGLVLLVAVFLKH-----PPGL : 249
V spinosum : --NETWLFRLHNVGFLVLLVAVFLPQSWKIGT-----E-----QFSISV : 264

NmNhaE	: RDVILIALTAVSMATIPKQVRAGNEENFEP	IAEVGKLFLEGI	FTITIPVLSILKAGEAGALGGVVS	: 353		
D vulgaris	: RDLGLLIGIAALSCLKLSTECRRLNEDWGP	IEEVAKLFAGIFVSMIPAIAILKAGEAGALAPVIN	: 360			
D baculatum	: RDVLLVALAFVSLKLTAPEIRRRNEDWGP	IEEVAKLFSGIFISMI PAISILRAGMDGALNGIIS	: 366			
L intracell	: RDIILLLLITGISLKLTKKESRKLNGEFSWEP	IQEVAKLFEGIFISMI PAITILRAGEHGVLPVIE	: 360			
E corrodens	: RDLILVALAVTSLAITPKQVRAGNEENWGP	IAEVGKLFLEGI	FTITIPVLAMLQAGEHGAFAPLIS	: 356		
K oralis	: RDAILLVVALISLWVTPKQVRAGNEENFDP	IAEVAKLFAGIFITIPVLAMLQAGEKGFASGVIA	: 364			
A vinelandii	: RDLLMGLALVSLKVTSKQVRAGNEEDWGP	IQEVAKLFAGIFLTIIPVLAAILRAGSEGHLAGIVA	: 353			
L nitroferum	: RDLILLLLIALLSLALTPRQVRAGNEENWAP	MLEVAKLFAGIFITIPVPAIAILRAGSDGHLAALVA	: 351			
L hongkongens	: RDLIMIGVALASLQFTPKKLRELNEENWFP	ILEVAKLFAGIFIAMAPAIAAILRAGVGGAMAPLVQ	: 352			
J sp.	: RDVALIAVFLSLAVTPKRTARSGNEFSWGP	IQEVAKLFAGIFITIPVIAMLRAGESGAFSAIVR	: 362			
H arsenic	: RDGLLIVVIFLSLWLTPEGARRGNEDSWGP	IQEVAKLFAGIFITIPVIAMLRAGESGAFSAIVR	: 353			
R eutropha	: RDALVVVVAVVSLVTPQAARAGNEENWEP	ILEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVR	: 358			
B sp.	: RDVALVGVTLASLALTPRSAREGNENWAP	IEEVAKLFAGIFVTIAPVIVILRAGADGAFAPIVH	: 360			
B phymatum	: RDVALIVVTLVSLAVTPRAAREGNENWAP	IEEVAKLFAGIFVTIAPVITMLQAGEAGAFSAIVY	: 372			
D acidovorans	: RDAGLIVVALLSRLTPRSVHQANEDSWGP	IQEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 360			
C testosteroni	: RDLGLLAVALLSLKLTIPARVHRANEDSWGP	MQEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 357			
P naphthalen	: RDAGLVAITLLSLNITAAKVHADNEDSWGP	MLEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 362			
D sp.	: RDAGLIAVTVASLALTPRQVHADNEDSWGP	MQEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 356			
V eiseniae	: RDLGLVVLVLLSLRITPAQVHADNEDSWGP	MQEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 355			
V paradoxus	: RDAGLIAITLVSFKTTAAKVHADNEDSWGP	MQEVAKLFAGIFLTIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 355			
L cholodnii	: RDVGLIVVTLVSLLETPHNARQONENWAP	MQEVAKLFAGIFLTIIPVLAAILRAGSDGHLAALVA	: 356			
M petroleiph	: RDVALVGVTLVSLKLTIPRGVHSDNEDSWGP	MLEVAKLFAGIFLTIIPVLAAILRAGSDGHLAALVA	: 363			
T intermedia	: RDAALVVALLSLALTPRQVHADNEDSWGP	MLEVAKLFAGIFLTIIPVLAAILRAGSDGHLAALVA	: 358			
R palustris	: RDGGLIVLALLSLWWTADHRSANGFTWEP	IREVAKLFAGIFVAIIPVLAMLQAGKAGLAFAPVLD	: 354			
B japonicum	: RNVALLAIAALS SVWLTPEHQRANGFTWEP	IREVAKLFAGIFVAIIPVIAMLRAGESGAFSAIVY	: 371			
M silvestris	: REAVMVAVALASLALINKSTREANGFTWEP	IREVAKLFAGIFICIPVMAMLRAGESGAFSAIVY	: 356			
O carboxido	: RDAIFVLVALASIRLTKADRANGFTWEP	IREVAKLFAGIFICIPVMAMLRAGESGAFSAIVY	: 354			
M loti	: RDAIILALAFVSLAVSRKEYREANGFNWGP	IAEVAKLFAGIFICIPVIAAILRAGHEGALAPLVA	: 354			
X autotrophic	: RDVLLVALALVSLAITPTIVRENGEDWEP	IMEVAKLFAAIFLTIIPVIAAILKAGSRGAFSAIVY	: 373			
L nitroferum	: RDVLLGIAALSALALTPGRCRAANENWAP	MLEVAKLFAGIFVTMIPVLAMLKAGSAGAFGNLVA	: 356			
R centenum	: RDVALIAIAAMSLKSTIRRSIRVENEDWGP	IQEVAKLFAGIFLTIIPALAILRSGTDGALAGLAH	: 380			
D hafniense	: RNLVLVAIMVISMKITAKTVRENEENSWGP	ILEIVYLFAGIFVTMAPALAILKAGESGALSIFITA	: 350			
S fumaroxidans	: RDGILVLMGILLSLTTATNVREDNEDWGP	ILEVGYLFAGIFISMPCLLVKAGSKGAADFVIE	: 365			
R intestinalis	: EVAILLALLSFKTTDSQIRTSNEDWGP	IKVAVLFI	GI	FTITMQPALMMLKSMGP	-----	: 363
R sp.	: EIVILLLAFLSFKTTDKQIRIRNEDWGP	IQEVAKLFAGIFITMQPALMMLKAVGP	-----	: 362		
E hallii	: EIAMILASAYLSFKTTKKEVRSSNEDWGP	IQEVAKLFAGIFITMIPALLILKARGS	-----	: 359		
C eutactus	: EIVIMLAAALLSFKTTSKKVRKANEDWGP	IQEVAKLFAGIFITMIPALLILKARGS	-----	: 364		
M thermoacetica	: RDLAILLAAFLSWKTTSMDIRKDNEDWGP	IKVAKLFAGIFMTMIPALAILHARGA	-----	: 385		
A sp2	: QEAGMLLMVALSWWTPRDLRRENGFTWGP	IEVAVVFA	IFCTMIPALQILNARGS	-----	: 345	
C phaeobacte	: REAIMFTVCFVAFKTDKDKAMKNEENFEP	IKVAKLFAGIFATMIPALELIGAYAQS	-----	: 362		
P aestuarii	: REVIMFAVAFIAYKAADQDALKGNEENFEP	IKVAKLFAGIFATMIPALELIGAYAAS	-----	: 364		
P phaeoc	: RELIMFMVAIAAYKFSNHEAFKNEENFEP	IKVAKLFAGIFATMIPALELIGYAYSS	-----	: 355		
C limicola	: RELILFAVSVAAYKTADHQALKGNEENFEP	IKVAKLFAGIFATMIPALELIGAYAAS	-----	: 353		
C tepidum	: REVIMLTIADVAYKTANQDALGNEENFEP	IKVAKLFVGI	FATMIPALQLIGAYAQS	-----	: 348	
R marinus	: REIIMFSVAVLAYKLADREALRKNEDFEP	IREVAKLFAGIFATMQPALQLISLFAHD	-----	: 384		
A sp1	: REVIMLTVAFLSFRFADKRAIEGNEENFEP	IREVAKLFAGIFGDMMPALELVGNFAKS	-----	: 355		
A asiaticus	: RELLILLLAWFSYRYASRIALQSNENFAP	IKVAVLFI	GI	FTITMMPALTLISNFAQS	-----	: 381
B Ellin514	: SEALMFGAAIGSYFATPGQIHKANEDFEP	IREVAKLFAGIFLTMVPALDYLVKHAGE	-----	: 305		
C flavus	: REVLMAAGAAIGSYRTIPRRVHEANEDFEP	IKVAKLFAGIFATMVPTLDYLECHAAS	-----	: 307		
V spinosum	: TALIMVAAAASLYLTKSKPVHEANEDFEP	IKVAVLFI	GI	FTITMVPALLELGSKGG	-----	: 321

NmNhaE	: LVHDTAGHPINVMFWMSGILSAFLDNAPTLYVFFNMAG-----GDAQALMTG-----	: 401
D vulgaris	: MV-THDGQPVTMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAMHLMN-----	: 406
D baculatum	: MVKTAEGLDNHTMYFWLTGILSAFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAQRLMT-----	: 413
L intracell	: LV-FKDGQPVNSMFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNTAT-----GDATHLMG-----	: 406
E corrodens	: LVHDAAGNPINTMYFWMTGMLSAFLDNAPTLYVFFNMAG-----GDAHTLMNG-----	: 404
K oralis	: LVHDAAGKPINAMYFWMSGMLSGFLDNAPTLYVFFNMAG-----GNPHELMRG-----	: 412
A vinelandii	: AVTRTDGTPIDGMYFWMSGLLSGFLDNAPTLYVFFNLAS-----GDAQTMN-----	: 400
L nitroferum	: LVSGEDGMPVNAMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDAQLLMK-----	: 398
L hongkongens	: LVSTPDGQPIDGMYFWMTGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPVHLMG-----	: 399
J sp.	: AVTDGNGQPINAMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAATLMT-----	: 409
H arsenic	: AVTDGNGAPINGMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAATLMT-----	: 400
R eutropha	: AVSDSNGQPVDGMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAATLMT-----	: 405
B sp.	: LVTGPDGKPIDAMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDAQSLMT-----	: 407
B phymatum	: VVNDTAGQPRDQMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDAQELMT-----	: 419
D acidovorans	: AVTRADGTPDPLMYFWASGLSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAQMLMT-----	: 407
C testosteroni	: AVTNADGTPNPAMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDPAHLMT-----	: 404
P naphthalen	: SVTRPDGTPDPAMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAQAMMT-----	: 409
D sp.	: AVTRPDGSPDPAMYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDAATLMT-----	: 403
V eiseniae	: AVTRPDGQPDAMYFWASGLSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDPATLMT-----	: 402
V paradoxus	: AVTRPDGQPDAMYFWASGLSSFLDNAPTLYVFFNTAG-----GDPATLMT-----	: 402
L cholodnii	: LVTAPDGQPIPAMYFWASGLSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPQVLMT-----	: 403
M petroleiph	: LVTAPDGQPIPAMYFWASGLSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPQVLMT-----	: 410
T intermedia	: LTSDAQGQPIAAMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPQVLMT-----	: 405
R palustris	: AVSGSDGTPREVYFWFTGILSAFLDNAPTLYVFFELAG-----GQPAELMG-----	: 401
B japonicum	: AVTAPDGTPREVYFWFTGILSAFLDNAPTLYVFFELAG-----GDPQVLMH-----	: 418
M silvestris	: LLEHADGSPNPNVYFWATGILSSFLDNAPTLYVFFELAG-----GDPAKLMG-----	: 403
O carboxido	: LVSRADGSANPAMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPQVLMT-----	: 401
M loti	: LVTSAQGTNNLAMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFELAG-----GDPHLMT-----	: 401
X autotrophic	: LVTGADGQPVNVWYFWLTGILSAFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPHQLMG-----	: 420
L nitroferum	: MVNDGSGTPLNPAMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GEPGQLMT-----	: 403
R centenum	: FVTGPDGNPIPAMYFWLTGILSSFLDNAPTLYVFFNLAA-----GDPEILMG-----	: 427
D hafniense	: AVKEPAQ-----YFWITGILSSFLDNAPTLYLTFESTAL-----GQFYPGVAEGPVAQF	: 399
S fumaroxidans	: AVREPAH-----YFWASGILSSFLDNAPTLYLTFESTAL-----GRFYPGMPESVAVPRF	: 414
R intestinalis	: ----ELGLSKPLEMFWATGILSSFLDNAPTLYVFFLTTAGTL-----GFTQGIATTVG----	: 411
R sp.	: ----NLGVTEPAEMFWATGILSSFLDNAPTLYVFFLTTAGTL-----AFTNGITTLG----	: 410
E hallii	: ----SLGLTEPWQFWITGILSSFLDNAPTLYVFFLTTAASL-----GFSSGIQTLTS----	: 407
C eutactus	: ----ELGLTHPAQFWMTGILSSFLDNAPTLYVFFLTTAASS-----GFTEGISTAMG----	: 412
M thermoacetica	: ----ELGLTHPAQFWATGILSSFLDNAPTLYVFFLTTATSL-----GATTGVPTTLG----	: 433
A sp2	: ----ALGITEPWQFWATGILSSFLDNAPTLYLTFASASGLL-----ETDASNLSLLVAS----	: 396
C phaeobacte	: --HAAEFVSR--FYWLTGILSGVLDNAPTLYLNFLAGSMGKFGSDIGSVEAVRTFADGIPSPVAA	: 423
P aestuarii	: --HAGDFSVTR--FYWMTGILSGVLDNAPTLYLNFLAGSMGKFGLDIGAMSVKFESEGVASPIAN	: 425
P phaeoc	: --HAAEFVSR--FYWLTGILSGVLDNAPTLYLNFLAGALGKFGLDIGSPEDIRHFATGVASPLQG	: 416
C limicola	: --HAGDFSVTV--FYWMTGILSGVLDNAPTLYLNFLAGALGKFGLDIGSSADIRSFAGVASPVQG	: 414
C tepidum	: --HAAEFTVTK--FYWFTGILSGVLDNAPTLYLNFLAGALGKFGLDNSIADVVKFSGRMDSPPIAG	: 409
R marinus	: --HAEQLTVGM--FYWGTGILSSVLDNAPTLYLNFLAAAMGKFGLDVNVPEQVRAFAEASVHP---	: 442
A sp1	: --PEGASLIHTHTLYWGTGILSGFLDNAPTLYLNFLAAAMASKGADINNIEQVRLFAA-----DG	: 412
A asiaticus	: --EAGINLIHTHTLYWGTGILSSVLDNAPTLYLNFLAAAMASKGADILQSEVYQYAMG-----QG	: 439
B Ellin514	: --LGLDSEMKF---FWLTGILSGALDNAPTLYLTLAAATGRHGLSLDNPAIDQAYIA-----	: 357
C flavus	: --LGITAPMHF---YWLSSGILSSVLDNAPTLYLTLAAAFGLKGLNIDDSAQVTQFLH-----	: 359
V spinosum	: --ITLTAPLQY---YFASGILSAFLDNAPTLYLTLAAAMGNAHLVDVGNPDVVSYLS-----	: 373

NmNhaE : --TLFHSLLAVSMGSAVFMGALTYIGNAPNEMVVKAI AEQRGVPMPTFFGYMM-WSVAFLTPVFIVH : 463
 D vulgaris : --DIPETLAAISAGAVFMGANTYIGNAPNEMVRSIAEEQGVMPSPFFGYMA-WSCGILVPCFILLV : 468
 D baculatum : --EVG-TLLAISAGAVVFFGACTYIGNAPNEMVRSIAETGGIKMPSFFGYMA-WSAGILVPSFVLM : 474
 L intracell : --EWAKTLCAISAGSVFMGANTYIGNAPNEMVRSIAVTHGISMPSFFGYML-WSICILFPFCILL : 468
 E corrodens : --HLFHTLLAVSMGSAVFMGALSIGNAPNEMVVKAI AEQRKVPMPGFFGYMA-WSFGILVPLFILH : 466
 K oralis : --ELFHTLLAISMGSVFMGALSIGNAPNEMVVKAI AEQRKVKMPSFFGYMT-WSFGILVPLFILH : 474
 A vinelandii : --ELPRTLVAISMGSVFMGALSIGNAPNEMVVKAI ADQRGVMPSPFFGYMG-WSCAILLPWFVLL : 462
 L nitroferum : --ELPQTLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEQRGVAMPGFFGFL-LWAGVILLPLFAGL : 460
 L hongkongens : --EMASTLLAISAGAVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEQGVKMPSPFFGYML-WSGLILLPLFVLV : 461
 J sp. : --TLAGTLAAISCGAVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AEERGIKMPSPFFGYMA-WSCAILLPFLVLM : 471
 H arsenic : --TMAATLAAISCGAVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AEERGIKMPSPFFAYMA-WSCAILLPFLVLM : 462
 R eutropha : --RDASTLAAISAGAVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AENRGVRMPSFFGYML-YSGTFLVPLFVIM : 467
 B sp. : --TGASTLAAISAGAVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AESRGVKMPSPFFAYLG-WALVVLIPVFLLT : 469
 B phymatum : --TGASTLAAISAGAVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AESRGVQMPGFFGYLA-WSCIVLPLFIAT : 481
 D acidovorans : --TMASTLAAISAGAVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEERGVKMPSPFFGYML-WSGLILLPLFVLM : 469
 C testosteroni : --EMALTLLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEDRGVKMPGFFGYML-WSVCVLLVPLVLI : 466
 P naphthalen : --TFASTLAAVSMGSAVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEERDVKMPSPFFGYML-WSGGVLLVPLFIIM : 471
 D sp. : --THAATLAAISAGAVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEDRGVKMPSPFFGYML-WSCGILVPLFVMM : 465
 V eiseniae : --RLAPTLLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEDRGVKMPSPFFAYMA-WSLAILLPFLIAM : 464
 V paradoxus : --TYATTLAAVSMGSVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AESRGVRMPSFFGYMG-WSVVVLIPLFVLS : 464
 L cholodnii : --TLAPVLAISMGSVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AEDRGLKMPSPFFGYMA-WSTLVLLPLFVAVM : 465
 M petroleiph : --TLAPVLAISMGSVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AEDRGLRMPSPFFGYMV-WSCGILLPLFVAVM : 472
 T intermedia : --HATTLMAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEHRGVKMPSPFFGYMG-WSLAILMPCFLLL : 466
 R palustris : --PLAGTLAISMGSVFMGALTYVGNAPNEMVYAI ATERGIRMPGFFGYAL-RVGAFLIPLFLLL : 463
 B japonicum : --ALSGTLAISMGSVFMGALTYIGNAPNEMVAST ARENGVEMPSFFGYLL-RAGAVLIPLFLLL : 480
 M silvestris : --PLASTLAAISLGSVFMGANSYIGNAPNEMVYAI ARNAGVKMPGFFPYLL-WSGAILLPLFALI : 465
 O carboxido : --TQAAVLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVYAI AREQGVKMPSPFFGYML-WSLAILLPFVLV : 463
 M loti : --EFASTLAAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVYAI ARQGVEMPSFFGYML-WSGLVLIPTFLIA : 463
 X autotrophic : --PLAVTLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVLSI ARHRGVKMPSPFFGYIG-WSIVFLVPCFALL : 482
 L nitroferum : --SLAPTLLAISMGSVFMGANSYIGNAPNEMVVKAI AEERGVAMPSPFFGYIG-WSLAILIPVFLLV : 465
 R centenum : --PLATTLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEEQGVKMPSPFFGYMA-WSLVCGLPLFIVL : 489
 D hafniense : LVEQPLYLLAISMGSVFFGAVTYIGNAPNEMVRSIAEESGVKMPSPFFGYMV-YSVCILLPLFGIV : 463
 S fumaroxidans : IAENAIYLLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVRSIAEEAGTPMPSPFFGYMFKYSIPVLCVTFVLV : 479
 R intestinalis : -TIPVKMLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVKSIAEENGVKMPSPFFGYLL-WSIVSLVVPFVID : 474
 R sp. : -TVPTKILSAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVVKAI AEDRGLKMPSPFFGYML-WSVAFLVVPFVID : 473
 E hallii : -FIPQTLMAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVRSIAEENGIKMPSPFFGYML-WSLSCLIPVFLID : 470
 C eutactus : -IVPQVLLMAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVRSIAEENGIKMPSPFFGYLA-WSVSLVVPFFVID : 475
 M thermoacetica : -VVAPKMLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVRSIAEENIRMPSPFFGYMG-WSIGILIPFLID : 496
 A sp2 : -EAGAGLLAISMGSVFMGANTYIGNAPNEMVKSIAEQSGVRMPGFFGYMA-YSGAVLVPLFVLV : 459
 C phaeobacte : DVSSDVYLLAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKNIAEQADMVPSFVEYVYKYSILPILVPFVAVI : 488
 P aestuarii : DVPSNIYLLAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKNIAEQADADVPSFVEYVYKYSIPVLVPLFIVI : 490
 P phaeoc : DVSSDIYLLAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKNIAEQADMVPSDFLEYIYKYSILPILLPFFILL : 481
 C limicola : DVSSGIYLLAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKNIAEQAEVDPDFLEYIYKYSIPVLIPFFAVI : 479
 C tepidum : DVPSTLYLLAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKNIAEQTEADVPSFVEYIYRYSIPVLLPVFGII : 474
 R marinus : --ETWFYLLAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVVKAI AENKVDMPSPFFGYVTKYSILPILIPYFLI : 505
 A sp1 : FHDSAFELMAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKSIAEQSGIKMPSPFFGYIIRFSLPILLPILILI : 477
 A asiaticus : FANSILRLKSAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKSIAEQLGVRMPAFFNYIYVFAIPFLPLFLV : 504
 B Ellin514 : --AHGHELIISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVKSIAEQAVKMPSPFFVYLFKYAVPILVPLFLLI : 420
 C flavus : --AHGIYVVAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVVKAI VDHAKVHTPNFFLYIIRYSILPILLPLAFV : 422
 V spinosum : --SHASYVVAISMVAVFFGANTYIGNAPNEMVVKAI ADKAKIHTPFGFLGYLFCFSIPILVPLIAV : 436

NmNhaE	: TLIFVFKLL-----	: 473
D vulgaris	: TWLFEM-----	: 474
D baculatum	: NYLFH-----	: 480
L intracell	: TWLFE-----	: 473
E corrodens	: TLIFVWQIL-----	: 476
K oralis	: TLVFFVQIF-----	: 484
A vinelandii	: TLFFF-----	: 467
L nitroferrum	: TWLFE-----	: 465
L hongkongens	: TLVFFHF-----	: 468
J sp.	: TFIFFT-----	: 477
H arsénic	: TFIFV-----	: 468
R eutropha	: TFLFFHV-----	: 474
B sp.	: SWIFTA-----	: 476
B phymatum	: SLIFE-----	: 486
D acidovorans	: SFIWER-----	: 475
C testosteroni	: TWIWEL-----	: 472
P naphthalen	: TFIWEK-----	: 477
D sp.	: TFIWLQ-----	: 471
V eiseniae	: TFIWER-----	: 470
V paradoxus	: TFIFFR-----	: 470
L cholodnii	: TLIWER-----	: 471
M petroleiph	: TFIWEL-----	: 478
T intermedia	: TVVFER-----	: 472
R palustris	: TVLPVPKLQLH-----	: 475
M silvestris	: TFLFLA-----	: 471
O carboxido	: TWLFE-----	: 468
M loti	: GFLFEG-----	: 469
X autotrophic	: TWLYI-----	: 488
L nitroferrum	: TLLFE-----	: 470
R centenum	: TFLFFHPA-----	: 497
D hafniense	: TWLFEL-----	: 469
S fumaroxidan	: TLIFQ-----	: 485
R intestinalis	: TLVFFL-----	: 480
R sp.	: MFVFFL-----	: 479
E hallii	: MLIFEL-----	: 476
C eutactus	: TLLFFLH-----	: 482
M thermoacetica:	: TLIFR-----	: 502
A sp2	: TVLFLV-----	: 465
C phaeobacte	: WVVFNF-----	: 495
P aestuarii	: WVFVFNH-----	: 497
P phaeoc	: WVLFFNY-----	: 488
C limicola	: WFLFFNH-----	: 486
C tepidum	: WFLFFHW-----	: 481
R marinus	: YLLFYSGLPGLDAFFEQLLIR	: 527
A spl	: WLIFFAFA-----	: 485
A asiaticus	: WLVCFFYLQIL-----	: 514
B Ellin514	: SILFFSRWRVF-----	: 431
C flavus	: GWVFLHK-----	: 429
V spinosum	: GWLIFR-----	: 442

Anexo 3- Tabela de aminoácidos com código de uma letra.

Aminoácido	Código de uma letra
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Ácido glutâmico	E
Cisteína	C
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T
Triptofano	W
Valina	V