

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

ANA PAULA ALVES DOS SANTOS SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS GLUTAMINA SINTETASE
MUTANTES DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

Maringá
2022

ANA PAULA ALVES DOS SANTOS SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS GLUTAMINA SINTETASE MUTANTES DE
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Marco Aurélio Schuler de Oliveira

Maringá
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação
(CIP)(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR,
Brasil)

S586c

Silva, Ana Paula Alves dos Santos

Caracterização de enzimas glutamina sintetase mutantes de *herbaspirillum seropedicae* / Ana Paula Alves dos Santos Silva. -- Maringá, PR, 2024.

70 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2024.

CDD 23.ed. 571.6

Jane Lessa Monção - CRB 9/1173

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA PAULA ALVES DOS SANTOS SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS GLUTAMINA SINTETASE MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovada em: 27/10/2022

Banca Examinadora



Prof. DR. Marco Aurélio Schuler de Oliveira
(Presidente)



Prof. Dr. Luís Paulo Silveira Alves
(membro examinador externo- USP)



Prof. Dra Gislaïne Cristiane Montovanelli
(membro examinador externo- UENP)

Josiele Abrahão de Souza

Prof. Dra. Josielle Abrahão de Souza
(membro examinador externo -UEM)

Paulo Bueno

Prof. Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno
(membro examinador externo – UEM)

Biografia

Ana Paula Alves dos Santos Silva é atualmente doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas sob orientação do prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira no Laboratório Bioquímica de Procariotos da Universidade Estadual de Maringá.

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2011). No ano de 2013, iniciou o curso de mestrado em Biologia das Interações Orgânicas pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2016, atuou como bolsista-técnica no Complexo de Apoio a Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá, na Central de Biologia Molecular.

Iniciou o curso de doutorado em 2018, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com o projeto intitulado Caracterização do Metabolismo de Assimilação do Amônio em *Herbaspirillum seropedicae*.

Ao longo da carreira acadêmica, desenvolveu atividades na área de Biologia Molecular e Microbiologia.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”
Sir Isaac Newton

Dedico este trabalho a todos que já passaram pelo meu caminho, deixaram um pouco de si e levaram um pouco de mim. Me deram suporte e contribuíram com minha formação, em todos os aspectos de minha vida.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os gigantes que estiveram ao meu lado durante toda a minha trajetória.

Quero agradecer minha mãe Raimunda e meu pai Ranulfo, por sempre estarem ao meu lado, e que por toda a vida deram todo o suporte e incentivo para que eu buscase a realização dos meus sonhos. Aos meus irmãos Janaína e Ranulfo Junior, assim como meu cunhado Itamar e meus sobrinhos Maria Antônia e João Lucas por todo apoio incondicional.

Me sinto agraciada por ter sido orientada pelo Prof. Dr. Marco Aurélio, quero agradecer-lo por dividir seu conhecimento comigo, por toda parceria, todos os ensinamentos, e por ser uma pessoa iluminada e extraordinária. Me sinto muito grata por todos esses anos de aprendizagem.

Agradeço, aos meus amigos de laboratório Eduardo Sabatine, Eduardo Lenym, Lorena, Larissa, Amanda, Barbara, Larissa Ricardini, por toda a contribuição e amparo durante esses anos de trabalho.

Aos técnicos Nunes e Odair por cooperarem tanto comigo durante a realização dos experimentos.

Às minhas primas Camila, Daiane e Kalinca, por me auxiliarem ao longo do caminho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, à todos os professores que contribuíram com a minha formação e à Érica por todo o suporte.

Ao Prof. Dr. Wanderley, ao Prof. Dr. Paulo Sérgio, à Prof. Dra Josielle, ao Prof. Dr. Luis Paulo e ao COMCAP, que foram essenciais durante minha formação.

À agência de fomento CAPES, que tornou possível a realização deste sonho, através de minha bolsa de estudos.

À todos os amigos que sempre contribuíram com os passos dados em minha caminhada.

À Deus, que sempre foi muito caprichoso na realização dos mínimos detalhes dos meus maiores sonhos.

À todos, meu mais sincero e profundo, obrigada!

Apresentação

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a tese foi redigida na forma de um artigo a ser submetido ao periódico FEMS Microbiology Letters com modificações para facilitar o entendimento do texto e para obedecer aos critérios estabelecidos pelas resoluções vigentes do programa de pós-graduação.

Resumo Geral

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar dano ao hospedeiro e promover o crescimento vegetal. Esses fatores fazem com que *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizada como um biofertilizante, uma alternativa eficiente e menos danosa do que fertilizantes nitrogenados. A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio, uma das vias de assimilação dessa molécula é a Glutamina Sintetase (GS). Nesta via, o glutamato é aminado à glutamina, que transfere seu grupo amida para o 2-OG para formar duas moléculas de glutamato. A regulação da velocidade fluxo metabólico através dessa via depende da regulação da atividade de GS, fornecendo uma maneira de manter os níveis intracelulares de glutamina constantes para atender as necessidades metabólicas da célula. O mecanismo de regulação da enzima GS de *H. seropedicae* ainda não foram completamente descritos. Aqui, nós construímos variantes da enzima GS de *H. seropedicae* contendo as mutações pontuais H250R, L293R, P349L e G54C e caracterizamos suas atividades in vitro. Construímos também uma estirpe da bactéria *H. seropedicae* que expressa a enzima GS contendo a mutação G130S para contribuir com o melhor entendimento dos mecanismos regulatórios da enzima GS de *H. seropedicae*.

Palavras-chave: *glnA*, Metabolismo de nitrogênio, Recombinação Homóloga, Enzimas mutantes, GS-GOGAT

Abstract

Herbaspirillum seropedicae is a bacterium capable of colonizing internal plant tissues without harming the host and promoting plant growth. These factors make *H. seropedicae* have great potential to be used as a biofertilizer, an efficient and less harmful alternative to nitrogen fertilizers. The preferred source of nitrogen in bacteria is ammonium, and one of the pathways of assimilation of this molecule is Glutamine Synthetase (GS). In this pathway, glutamate is aminated to glutamine, which transfers its amide group to 2-OG to form two glutamate molecules. The regulation of the rate of metabolic flux through this pathway depends on the regulation of GS activity, providing a way to keep intracellular glutamine levels constant to meet the metabolic needs of the cell. The mechanism of regulation of the GS enzyme of *H. seropedicae* have not yet been fully described. Here, we constructed variants of the GS enzyme of *H. seropedicae* containing the point mutations H250R, L293R, P349L, and G54C and characterized their activities in vitro. We also constructed a strain of *H. seropedicae* bacteria expressing the GS enzyme containing the G130S mutation to contribute to a better understanding of the regulatory mechanisms of the GS enzyme of *H. seropedicae*.

Key words: *glnA*, Nitrogen metabolism, Homologous recombination, Enzyme mutant, GS-GOGAT.

Sumário

Apresentação	1
Resumo Geral	2
Abstract	3
Lista de Abreviações	4

Capítulo 1

Construção de Variantes Mutantes da Enzima Glutamina Sintetase de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5
Resumo	7
Introdução	9
Materiais e Métodos	14
Resultados.....	19
Discussão.....	37
Agradecimentos	39

Capítulo 2

Construção de uma Estirpe Mutante de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> no gene <i>glnA</i>	43
Resumo	45
Introdução.....	47
Materiais e Métodos	51
Resultados.....	55
Discussão.....	60
Agradecimentos	60
Referências	61

LISTA DE ABREVIÇÕES

2-OG	2 oxoglutarato
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosina Trifosfato
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino-tetra-acético
GDH	Glutamato Desidrogenase
GLN	Glutamina
GOGAT	Glutamato Sintase
GS	Glutamina Sintetase
Km	Canamicina
Mg ²⁺	Magnésio
Mn ²⁺	Manganês
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NH ₄	Amônio
nm	nanômetro
pb	Pares de Base Nucleotídicas
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
P _i	Fosfato Inorgânico
Sm	Estreptomicina
UMP	Uridina monofosfato

Capítulo I

Artigo:

Construção de Variantes Mutantes da Enzima Glutamina Sintetase de *Herbaspirillum seropedicae*

**Construção de Variantes Mutantes da Enzima Glutamina Sintetase de
*Herbaspirillum seropedicae***

Ana Paula Alves dos Santos Silva¹; Marco Aurélio Schuler de Oliveira¹

1 Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica – Maringá, Paraná,
Brasil

Autor correspondente:

Avenida Colombo 5790 – BAIRRO : ZONA 07; CIDADE : MARINGÁ; UF:
PR CEP.: 87020-90

Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Bioquímica - Bloco I89- SALA
015

Resumo

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria capaz de fixar nitrogênio e colonizar tecidos internos de plantas sem causar qualquer dano a elas. A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio, uma das vias de assimilação dessa molécula é a via Glutamina Sintetase e Glutamato Sintase. Nesta via, a assimilação consiste na condensação do amônio com o esqueleto carbônico do 2-oxoglutarato para formar glutamato e glutamina que servem como doadores de grupo amino para reações biossintéticas da célula. O fluxo metabólico através dessa via é fortemente regulado, sendo GS o principal alvo de regulação, que ocorre tanto alostericamente quanto por modificação pós-traducional. A regulação da velocidade fluxo metabólico através dessa via depende da regulação da atividade de GS, fornecendo uma maneira de manter os níveis intracelulares de glutamina constantes para atender as necessidades metabólicas da célula. O mecanismo de regulação da enzima GS de *H. seropedicae* ainda não foi completamente descrito. O presente trabalho teve como objetivo construir e expressar variantes enzimáticas contendo mutações pontuais sítio-dirigidas no gene *glnA*, que codifica GS, para realização de estudos *in vitro* e também fornecer dados que contribuam para o melhor entendimento da via de assimilação de amônio de *H. seropedicae*.

Palavras-chave: *glnA*, amônio, Glutamina

Abstract

Herbaspirillum seropedicae is a bacterium capable of fixing nitrogen and colonizing internal plant tissues without causing any harm to them. The preferred source of nitrogen in bacteria is ammonium, and one of the pathways of assimilation of this molecule is the Glutamine Synthetase and Glutamate Synthase pathway. In this pathway, assimilation consists of the condensation of ammonium with the carbon skeleton of 2-oxoglutarate to form glutamate and glutamine, which serve as amino group donors for biosynthetic reactions of the cell. Metabolic flux through this pathway is tightly regulated, with GS being the main target of regulation, which occurs both allosterically and by post-translational modification. The regulation of metabolic flux velocity through this pathway depends on the regulation of GS activity, providing a way to keep intracellular glutamine levels constant to meet the metabolic needs of the cell. The mechanism of regulation of the GS enzyme of *H. seropedicae* has not yet been fully described. The present work aimed to construct and express enzyme variants containing site-directed point mutations in *glnA* gene, which encodes GS, to perform *in vitro* studies and also to provide data that contribute to the better understanding of the ammonium assimilation pathway of *H. seropedicae*.

Key-Words: *glnA*, ammonium, glutamine

1. Introdução

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae é uma bactéria gram-negativa, vibrióide, membro da classe β do filo proteobactérias, capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano aparente ao hospedeiro (Baldani et al, 1986; Olivares et al, 1997). Evidências recentes apontam que o nitrogênio fixado por *H. seropedicae* é incorporado na biomassa da planta hospedeira (Pankievicz et al, 2015). Além disso, *H. seropedicae* pode contribuir para o crescimento da planta pela produção de fitohormônios (Bastian et al, 1998). *H. seropedicae* já foi isolada da rizosfera e tecidos de várias plantas, incluindo espécies economicamente importantes, como cana de açúcar, milho, trigo e arroz (Baldani et al. 1986; Baldani et al. 1992; Baldani e Baldani 2005). Esses fatores fazem com que *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante, sendo uma alternativa mais eficiente e menos poluente que os fertilizantes nitrogenados.

1.2 Assimilação do Nitrogênio

A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio, o qual é combinado com o esqueleto carbônico do 2-oxoglutarato (2-OG) para formar glutamina e glutamato (Merrick e Edwards, 1995). Esses aminoácidos, por sua vez, servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas.

O amônio pode ser assimilado por duas vias distintas: via Glutamato Desidrogenase (GDH) ou via Glutamina Sintetase (GS) (Figura 1). A enzima GDH combina amônio e 2-OG para formar glutamato. Quando a enzima GS é usada, o glutamato é aminado à glutamina, a qual tem seu grupo amida transferido para o 2-OG pela enzima Glutamato Sintetase (GOGAT) para formar duas moléculas de glutamato (Bulen and LeComte, 1966; Hageman and Burris, 1978).

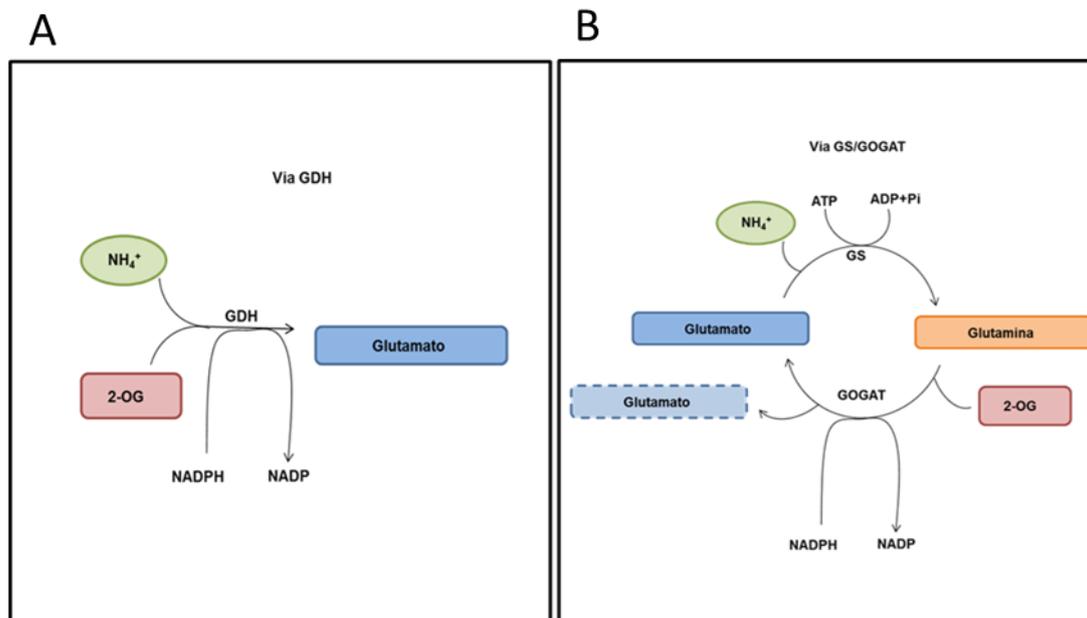


Figura 1 - Vias de assimilação de amônio em bactérias. O painel da esquerda mostra a via GD (A)H, e o da direita a via cíclica GS/GOGAT (B). A via GDH consiste de uma única enzima, a glutamato desidrogenase (GDH). Uma molécula de glutamato é formada a partir da reação de aminação do 2-OG; ATP não está envolvido. O ciclo GS/GOGAT consiste de duas enzimas, a glutamina sintetase e a glutamato sintase. Em ciclo, essas duas enzimas também produzem glutamato pela aminação redutiva do 2-OG.

1.2.1 Glutamina Sintetase (GS)

A glutamina sintetase bacteriana, codificada pelo gene *glnA*, é uma proteína dodecamérica formada pela união face a face de dois anéis hexaméricos (Almassy et al, 1986). Desta forma, GS possui doze sítios ativos, com estrutura descrita como “funil duplo”, no qual o ATP e glutamato se ligam em extremidades opostas. No local de encontro do funil duplo, há dois sítios de ligação para íons divalentes (n1 e n2) onde o Mg^{2+} ou o Mn^{2+} podem se ligar para a catálise. O primeiro íon (n1) auxilia na ligação do glutamato e estabiliza a GS em sua estrutura ativa (Shapiro e Stadtman, 1968), enquanto o n2 está envolvido na transferência de fosforil (Hunt et al, 1975). Os anéis hexaméricos da GS se mantêm unidos graças às interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre eles (Almassy et al, 1986). A atividade de GS pode ser regulada de múltiplas formas. Metabolicamente, o fluxo através de GS pode ser regulado até quatro vezes. Essa regulação metabólica ocorre via níveis de substrato (amônio e glutamato intracelular), inibição pelo produto (glutamina), o estado redox da célula (NADPH), e o estado energético da célula (ATP) (van Heeswijk, 2013).

Cada uma dessas substâncias inibe a enzima de forma parcial, mas quando atuam em conjunto possuem a capacidade de diminuir significativamente a atividade da enzima. Isso é possível, pois cada um dos inibidores atua em um sítio diferente da enzima (Woolfolk e Stadtman, 1967). Esse mecanismo é conhecido como efeito inibitório cumulativo. A regulação da atividade de GS fornece uma maneira de manter os níveis intracelulares de glutamina constantes, de forma a atender as necessidades metabólicas da célula naquele momento.

Além da regulação metabólica, a atividade de GS pode ser regulada por adenililação reversível de um resíduo conservado de tirosina em cada subunidade (Reitzer, 2003). Em *Escherichia coli* e *Rhodospirillum rubrum*, essa modificação pós-traducional é realizada em resposta a altos níveis de nitrogênio pela enzima GlnE (Arcondéguy et al, 2001). A modificação intensifica a sensibilidade aos inibidores alostéricos, e a atividade enzimática diminui à proporção que mais subunidades são adenililadas (Nelson e Cox, 2014). Em *H. seropedicae*, através de um estudo proteômico, três diferentes formas de GS foram identificadas em gel 2D, indicando uma possível modificação pós-traducional não convencional nessa proteína além da adenililação, a qual ainda é desconhecida (Huerger et al, 2010).

1.2.1.1 Reações catalisadas por GS

A atividade da enzima Glutamina Sintetase pode ser avaliada através de duas reações distintas catalisadas por ela: a biossintética e a γ -glutamil transferase (γ -GT).

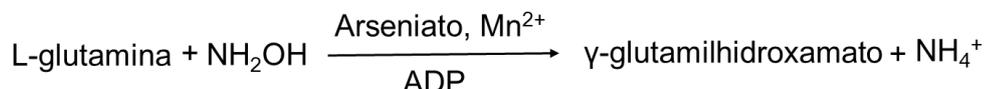
A reação mais importante catalisada pela glutamina sintetase é a síntese da glutamina, por isso é chamada de reação biossintética. Essa reação pode ter como cofatores o Mg^{+2} ou o Mn^{+2} , e está descrita a seguir:



Se o amônio for substituído por hidroxilamina (NH_2OH), o produto da reação é o γ -glutamilhdroxamato (Farnden e Robertson, 1980), o qual pode ser quantificado por colorimetria.

Na atividade conhecida como γ -glutamil transferase, ocorre a reação inversa: a enzima catalisa a transferência do grupamento γ -glutamil da glutamina para

hidroxilamina formando o γ -glutamilhdroxamato (Woolfolk et al, 1996), de acordo com a reação descrita a seguir:



1.2.2 GlnE

GlnE é uma enzima com 946 aminoácidos e 3 domínios funcionalmente e estruturalmente distintos. Ela é uma enzima bifuncional, ou seja, capaz de catalisar duas reações distintas: adição do grupamento AMP ao resíduo conservado de tirosina de GS (adenililação), ou remoção deste grupamento AMP (desadenililação). Essas duas atividades não consistem simplesmente na mesma reação em direção oposta, já que as duas atividades de GlnE (ATase – Adenilil Transferase/AR - Adenilil Removedora) estão localizadas em dois domínios diferentes. O domínio N-terminal tem atividade AR e o domínio C-terminal tem atividade ATase (Jaggi et al, 1997; Clancy et al, 2007; Jiang & Ninfa, 2007). Entre esses dois domínios catalíticos possivelmente se encontra um domínio regulatório (R), no qual, em *E. coli*, supostamente se liga a proteína regulatória transdutora de sinal PII (Clancy et al, 2007). A transdução dos níveis de nitrogênio para a proteína GlnE é feita através do sistema Ntr, descrito a seguir.

1.3 Regulação da modificação pós-traducional de GS

A regulação pós-traducional de GS é mediada pelo sistema Ntr, que consiste em um conjunto de proteínas com função integrada que regulam o metabolismo de nitrogênio em Proteobactérias (Figura 2). Em *E. coli* a enzima GlnE, que catalisa a adenililação reversível de GS, tem sua atividade regulada pelas proteínas do tipo PII, como GlnB. Neste modelo, altos níveis de nitrogênio fixado promovem a formação de um complexo de GlnE com GlnB livre e glutamina, catalisando a adenililação de GS (reação ATase), que leva a sua inativação. Nesses organismos, em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a GS é ativada por desadenililação (reação AR) também catalisada por GlnE complexada a GlnB-UMP₃ (Reitzer, 2003).

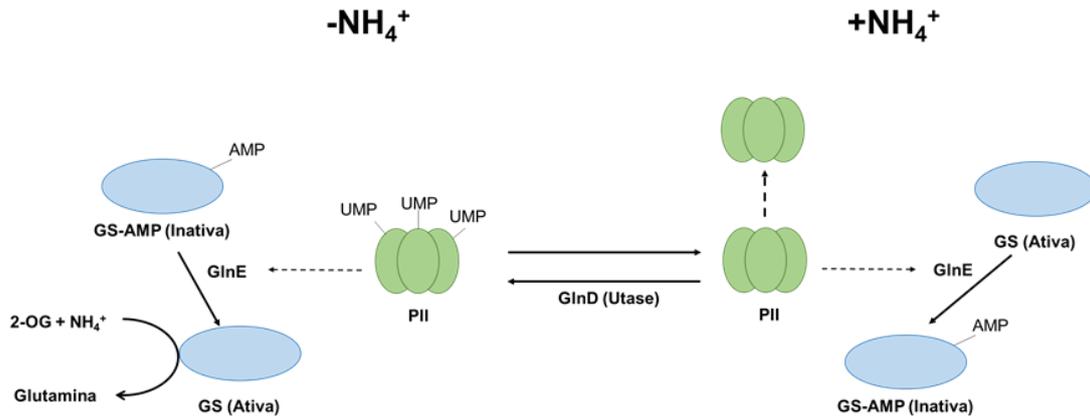


Figura 2 - Modelo da regulação de GS pelo sistema Ntr de proteobactérias. Em baixas concentrações de nitrogênio, as proteínas PII são uridililadas por GlnD. PII-UMP interage com GlnE, que desadenila GS, ativando-a. GS catalisa a síntese de glutamina a partir de 2-OG (2-oxoglutarato) e amônio. Com altas concentrações de amônio, PII é desuridilada por GlnD. Nessa forma, interage com GlnE, que adenila GS, diminuindo sua atividade.

Em *H. seropedicae* não está claro o papel do sistema Ntr na regulação da atividade de GS. Experimentos realizados com estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *ntrB* e *ntrC*, que codificam para proteínas relacionadas com a resposta transcricional de condições de baixa disponibilidade de nitrogênio fixado, mostraram que essas estirpes tinham deficiência na atividade de GS (Persuhn et al, 2000). Os resultados levaram aos autores a sugerir que a uma proteína PII poderia transduzir os níveis de nitrogênio para GS regulando sua adenililação. Como a atividade de GS no mutante *glnB* não foi afetada, a proteína candidata para essa função foi GlnK, cuja expressão é dependente de NtrC.

Posteriormente, no entanto, experimentos realizados com uma estirpe de *H. seropedicae* mutante no gene *glnK* mostraram que o produto desse gene parece não estar relacionado com a regulação da atividade de GS, visto que a atividade dessa enzima foi semelhante à estirpe selvagem em todas as condições testadas (Noindorf, 2006). Na bactéria *Azospirillum brasilense* as proteínas PII também parecem não estar relacionadas com a regulação da atividade de GS (de Zamaroczy et al, 1996; de Zamaroczy et al, 1998). O papel do sistema Ntr na regulação da enzima GS de *H. seropedicae* ainda precisa ser esclarecido.

1.4 Mutantes Excretores

Em um trabalho de seleção de mutantes espontâneos gerados pela exposição da estirpe selvagem de *A. brasilense Sp7* a etilenodiamina, foram encontradas 4 estirpes mutantes capazes de excretar amônio (Machado et al, 1991). Essas estirpes foram denominadas HM014, HM026, HM053 e HM210. Enquanto a estirpe selvagem tem a fixação de

nitrogênio inibida por altas concentrações de amônio, essas estirpes mutantes são capazes de fixar nitrogênio constitutivamente mesmo em concentrações altas de amônio. Esses e outros fenótipos encontrados nas estirpes mutantes têm sido atribuídos a mutações pontuais no gene *glnA*, que codifica a enzima GS. O gene *glnA* das estirpes mutantes já foi sequenciado, e as mutações presentes nele identificadas (dados não publicados). Esses resultados sugerem que o conhecimento do mecanismo de regulação da atividade de GS de *H. seropedicae* poderá sugerir formas de manipular geneticamente a bactéria com o objetivo de gerar estirpes capazes de fixação de nitrogênio de forma constitutiva e, conseqüentemente, de excretar amônio, com potencial para serem utilizadas como biofertilizantes.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo expressar e caracterizar variantes da enzima Glutamina Sintetase de *H. seropedicae* contendo mutações pontuais sítio-dirigidas, para que a regulação da via de assimilação de amônio de *H. seropedicae* possa ser caracterizada *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Meios de cultura e condições de cultivo

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de rotina das estirpes de *Escherichia coli* foram Luria-Bertani (LB) (meio líquido) e Luria Bertani Agar (LA) (meio sólido) (Sambrook et al., 1989). O cultivo em meio líquido foi feito a 37°C, sob agitação a 130 rpm e o cultivo em meio sólido em estufa microbiológica overnight a 37°C.

Para superexpressão das variantes de GS em *E. coli* deste trabalho foi utilizado o meio mínimo M9 (Sambrook et al., 1989) adicionado de 20 mM de cloreto de amônio ou 100 mM de glutamina como fonte de nitrogênio, conforme indicado em cada experimento.

Todos os meios utilizados continham os antibióticos adequados para determinada seleção em cada etapa do experimento.

2.2 Bactérias e plasmídeos

As bactérias utilizadas neste trabalho foram *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) (estirpe para propagação e estoque de plasmídeos) e *E. coli* BL21 (superexpressão de proteínas). Utilizamos também a estirpe parental *H. seropedicae* SmRI (Souza et al., 2000).

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram o pETNde-M11 (Little et al, 2011) e o pK18-mobSacB (Schäfer et al., 1994).

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação dos genes de estudo em um volume final de 25 μ L foi feita a seguinte reação: 2,5 μ L do tampão da phusion DNA polimerase 10X, 0,5 μ L de dNTPs 10 mM, 0,75 μ L de cloreto de magnésio 50 mM, 0,5 μ L de phusion DNA polimerase (produção própria), 2 μ L de solução contendo DNA genômico de *H. seropedicae*, 16,75 μ L de água ultrapura e 1 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1) 10 pM. A reação foi realizada em 25 ciclos de desnaturação (98°C, por 30 segundos), anelamento em gradiente de temperatura (45 segundos) e extensão (72°C, por 1 minuto). Após o final dos ciclos, 7 minutos de extensão a 72°C.

Nome	Sequência 5'- 3'
H250R_fwd	CGTCGCCCCGCACCTATGGCA
H250R_rev	TGCCATAGGTGCGGGCGACG
L293R_fwd	GGCTATGCTGGCCGCTCCGA
L293R_rev	TCGGAGCGGCCAGCATAGCC
P349L_fwd	CCGTATCCTGCACGTGGCCA
P349L_rev	TGGCCACGTGCAGGATACGG
G54C_fwd	GCCTTCGACTGTTCGTCGATCGC
G54C_rev	GCGATCGACGAACAGTCGAAGGC
GlnA_fwd	ATGGCAAGGACGGCCGCAGAGGTTTTGA...
GlnA_rev	ACGCACCCGATCGAATTTCGACATGTACT...

Tabela 1 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que foram utilizados nas reações da PCR deste trabalho

2.4 Amplificação de 5 variantes do gene que codifica para GS

Após a realização de um alinhamento estrutural de sequências entre o gene *glnA* de *Azospirillum brasiliense* e *Herbaspirillum seropedicae*, foram selecionadas determinadas regiões deste gene, que codifica a enzima Glutamina Sintetase, e as substituições H250R, P349L, L293R e G54C foram adicionadas no gene *glnA* de *H. seropedicae*. Assim, na posição 250, o aminoácido Histidina foi substituído por Arginina (H250R), na posição 293, o aminoácido Leucina foi trocado por Arginina (L293R), em

349 substituímos uma prolina por uma leucina (P349L) e na posição 54, uma glicina alterada para cisteína (G54C).

Para construir esses genes contendo as mutações pontuais, o gene *glnA* foi submetido a duas ampliações por PCR com dois pares de iniciadores para cada mutação: um par abrangendo a região inicial do gene até o ponto da mutação (fragmento *up*) e o outro par abrangendo a região partir da mutação até o final do gene (fragmento *down*). Os primers internos das ampliações *up* e *down* eram complementares entre si e possuíam a mutação pontual desejada. Os fragmentos *up* e *down* eram então unidos em uma nova reação de PCR, utilizando os primers flanqueadores do gene, a PCR *overlapping*. O esquema de construção dos mutantes está mostrado na Figura 3. Para a clonagem em vetor de expressão, os primers flanqueadores usados foram o GlnA_fwd e GlnA_rev.

O produto dessa segunda reação de PCR correspondia ao gene *glnA* contendo a mutação desejada.

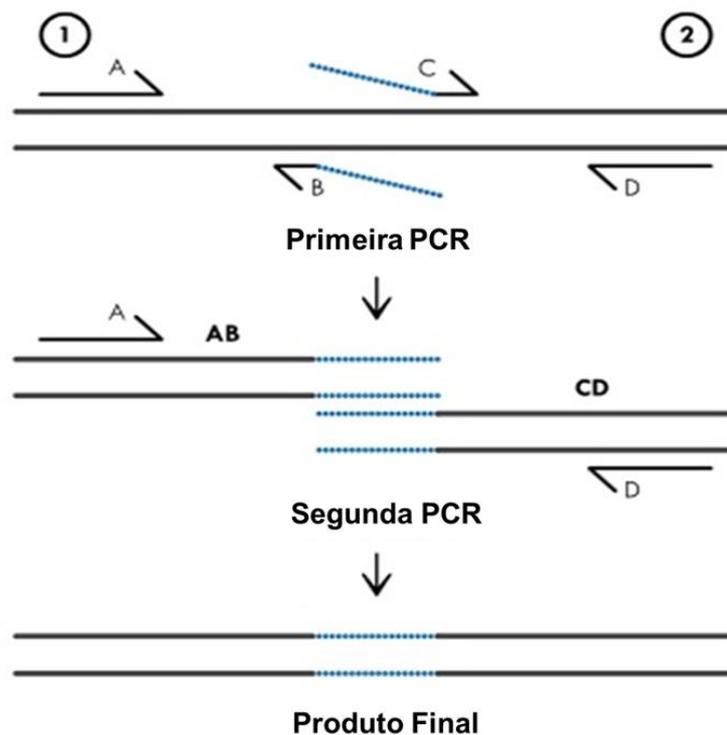


Figura 3. Estratégia utilizada nas reações de PCR para a síntese das variantes mutantes do gene *glnA*. Os primers internos são complementares e possuem a mutação pontual desejada. As regiões inicial e final do gene foram amplificadas separadamente. A seguir, uma nova PCR foi realizada, utilizando os produtos da primeira PCR como molde,

com os primers externos. O produto final corresponde ao gene *glnA* contendo a mutação desejada.

Para a clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de expressão pETNde-M11, os fragmentos correspondentes ao gene *glnA* contendo as mutações foram clonados nos sítios *NdeI* e *XhoI* do vetor.

2.5 Expressão e purificação das Proteínas das variantes mutantes

Uma vez confirmada a clonagem, os plasmídeos recombinantes derivados do pETNde-M11 foram então transformados em *E. coli* BL21(DE3). As células transformantes foram crescidas durante a noite em pré-inóculos de 3 mL de meio LB. Posteriormente, 500µL do pré-inóculo foram transferidos para frascos contendo 50 mL de meio M9, a fonte de nitrogênio oferecida era diferenciada entre 20 mM de amônio ou 27 mM de glutamina, simulando ambientes de alta disponibilidade de nitrogênio e baixa disponibilidade de nitrogênio, para que a GS fosse modificada de acordo com a condição oferecida. A enzima superexpressa em meio contendo amônio foi chamada de “GS-N” e a enzima expressa em meio contendo glutamina foi chamada de “GS-gln”.

As células foram mantidas sob agitação a 37°C até DO₆₀₀ em torno de 0,5 e, então, a expressão da proteína foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 3 horas a 37°C. Após indução as células foram coletadas por centrifugação durante 10 min a 11.000 x g e o pellet estocado a -20°C até o momento do uso.

As proteínas superexpressas nessas células foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE para checagem da superexpressão.

Após confirmação da superexpressão, as proteínas superexpressas, as quais continham cauda-His, foram purificadas em coluna de níquel. As frações solúveis das culturas lisadas por sonicação foram injetadas na coluna HiTrap Chealating (Cytiva) de 5 mL carregada com níquel e eluídas em gradiente de imidazol. As frações eluídas durante o processo foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE.

2.6 Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas de extratos foi feita utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A quantificação de proteínas purificadas foi feita pela absorbância em 280 nm em um nano-espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fischer).

2.7 Atividade GS

2.7.1 Reação Biossintética

As reações biossintéticas de GS foram realizadas em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 5 µg de proteína GS para proteínas purificadas ou 5 µg de proteína total para os extratos das estirpes de *H. seropedicae* e o mix biossintético, que contém Imidazol pH 7,5 (100 mM), hidroxilamina (50 mM), MgCl₂ (60 mM), glutamato (170 mM). As reações foram disparadas pela adição de ATP (concentração final de 14 mM) e incubada a 37°C por 60 minutos.

A reação foi parada com a adição de um Stop Mix, composto de Cloreto férrico (0,04 mM), Ácido tricloroacético (0,12 mM) e Ácido Clorídrico (0,61 mM). A quantificação da reação foi feita através da leitura da absorbância a 490 nm do produto.

As reações com mix biossintético também foram realizadas com os íons Mn²⁺, adicionando-se MnCl₂ (60 mM) ao invés de MgCl₂.

2.7.2 Reação de γ-GT

A Reação γ-GT da GS foi realizada em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 5 µg de proteína GS para proteínas purificadas ou 5 µg de proteína total para os extratos de estirpes de *H. seropedicae* e o mix γ-GT que é composto por Imidazol (77,14 mM), Hidroxilamina (11,4 mM), MnCl₂ (0,17 mM), MgCl₂ (1,15 mM), Arseniato de Potássio (14,3 mM) e ADP (0,23 mM).

As reações foram disparadas adicionando-se glutamina (concentração final 14 mM) e incubada a 37°C por 60 minutos.

A reação foi parada com a adição de um Stop Mix, que é composto de Cloreto férrico (0,04 mM), Ácido tricloroacético (0,12 mM) e Ácido Clorídrico (0,61 mM).

A quantificação do produto foi feita a partir da leitura da absorbância em 490 nm.

2.8 Reação de Adenililação e Desadenilação

As reações de adenililação e desadenililação foram realizadas, em microtubos de 1,5 mL aos quais foram adicionados 5 µg de proteína Glutamina Sintetase e o mix de cada reação.

Para a realização da reação de adenililação, foi adicionado o mix composto de Tris pH 7,5 (5 mM), KH₂PO₄ (25 mM), BSA (2 mg/mL), ADP (1 mM), Glutamina (1 mM) e ATP (0,2 mM).

As reações de desadenililação também foram realizadas, em microtubos de 1,5 mL. Foram adicionados o mix de desadenilialção, que é composto por Tris pH 7,5 (5 mM), KH_2PO_4 (25 mM), BSA (2 mg/mL) e ATP (0,2 mM).

2.9 Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF)

A técnica de DSF foi utilizada para analisar a ligação de ATP, ADP, glutamina e glutamato às variantes da enzima GS do presente estudo. Para isso, as proteínas foram incubadas com o corante fluorescente SYBR Orange (Thermo), que emite fluorescência mediante desnaturação proteica. O desdobramento da proteína foi quantificado por fluorescência em função da temperatura em um termociclador Step One Plus (Thermo). A temperatura de desnaturação foi determinada pela análise da derivada da fluorescência bruta em cada sistema e obtida em diferentes concentrações do ligante. Para a realização do DSF foram preparadas reações de 20 μl , contendo 5 μg da proteína Glutamina Sintetase, 4 μL de Tampão de interação 5 vezes concentrado (Tris 500 mM, KCL 50 mM e MgCl_2 125 mM), concentrações variáveis da molécula ligante e 1 μL do corante SYBR Orange 100 vezes concentrado. A temperatura inicial das medições foi de 25°C por 60 segundos, e o sistema foi aquecido até 95° por 15 segundos em cada temperatura, aumentando +0,3 °C em cada passo. Para a medida da fluorescência o corante foi excitado a 472 nm e emissão lida em 570 nm.

3. Resultados

3.1. Amplificação e clonagem em vetor de expressão das variantes mutantes do gene que codifica para GS

Para a amplificação dos genes codificantes de versões mutantes da enzima GS (H250R, P349L, L293R e G54C), foram feitas duas amplificações com dois pares de iniciadores para cada mutação: um par abrangendo a região inicial do gene (fragmento *up*) e o outro par abrangendo a região final do gene (fragmento *down*). Os primers internos eram complementares e possuíam a mutação pontual desejada. As regiões inicial e final do gene foram amplificadas separadamente. As eletroforeses dos fragmentos *up* e *down* amplificados estão mostradas nas Figuras 4 e 5.

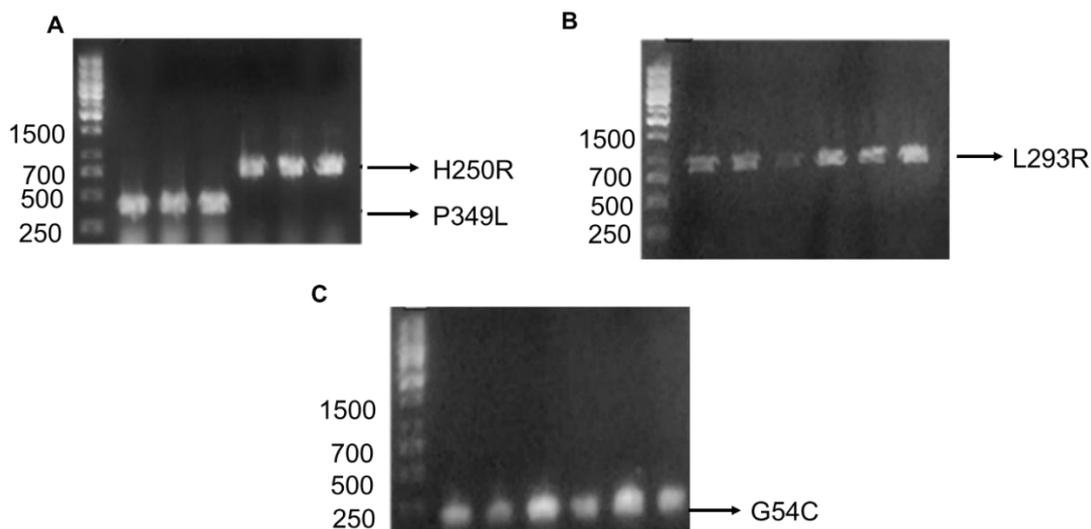


Figura 4 - Amplificação dos fragmentos *down* do gene para inserção da mutação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV. O primeiro poço de cada gel contém o marcador 1kb fermentas – GeneRuler. Amplificação do fragmento *down* da mutação A) P349L (379 pb) e H250R (760 pb); B) L293R (884pb); C) G54C (179 pb).

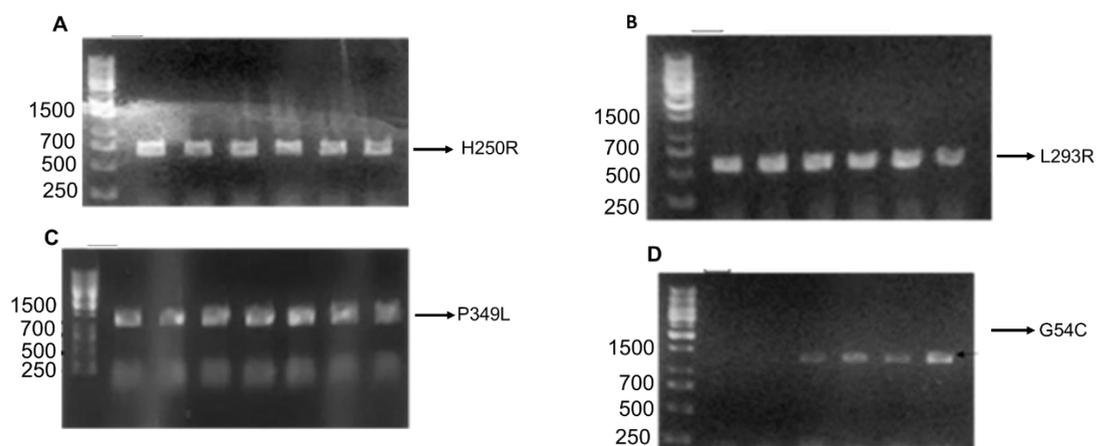


Figura 5 - Amplificação dos fragmentos *up* do gene para inserção da mutação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV. O primeiro poço de cada gel contém o marcador 1kb fermentas – GeneRuler. Amplificação do fragmento *up* da mutação A) H250R (676 pb) B) L293R (884 pb) C) P349L (1057 pb) D) G54C (1266 pb).

Os produtos de PCR amplificados foram purificados com o Kit Easy Pure - PCR Purification (Transgen Biotech). A seguir, os fragmentos *up* e *down* foram unidos através de uma PCR *overlapping*, utilizando os produtos da primeira PCR como molde, amplificando a partir dos primers externos flanqueadores (GlnA_fwd e GlnA_rev). O produto dessa segunda reação de PCR correspondia ao gene *glnA* contendo a mutação desejada. O resultado da PCR *overlapping* está mostrado na Figura 6.

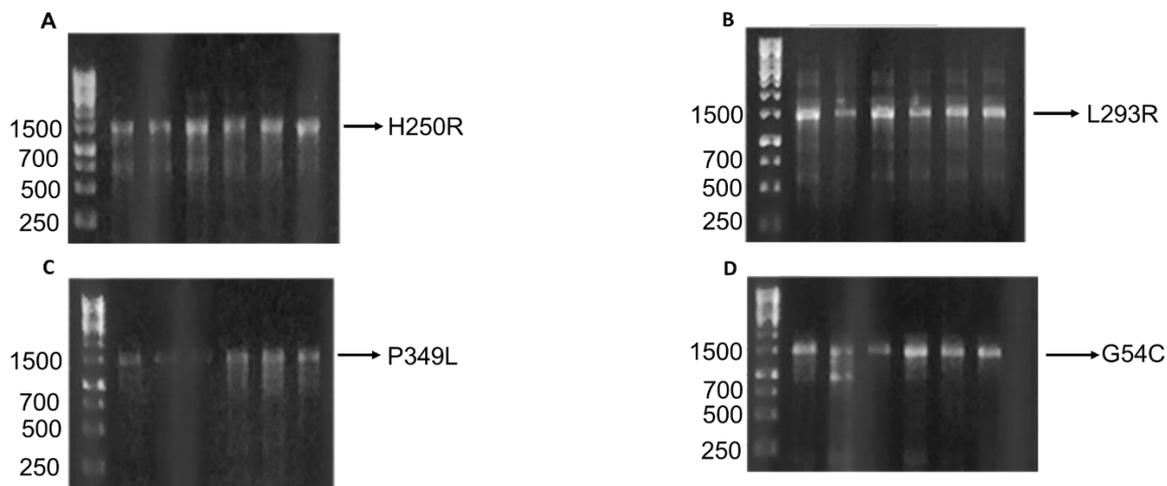


Figura 6 - PCR overlapping. Os fragmentos, produtos da segunda reação de PCR, foram amplificados em gradiente de temperatura. As amostras foram corridas em gel de agarose 1%, tratado com brometo de etídeo, a 70V, o marcador utilizado foi 1kb ladder Fermentas – GeneRuler. Amplificação do gene *glnA* e inserção da mutação **A)** H250R **B)** L293R **C)** P349L **D)** G54C.

Após a realização da reação de PCR para amplificação dos fragmentos *up* e *down* do gene e a PCR *overlapping* para inserção das mutações H250R, L293R, P349L e G54C, os fragmentos foram clivados com as endonucleases de restrição *NdeI* e *XhoI* para clonagem no vetor de expressão pETNde-M11.

A clonagem dos fragmentos para a construção do plasmídeo recombinante foi confirmada através da digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição (dados não mostrados).

3.2 Purificação das Proteínas Recombinantes

Após a superexpressão em todas as condições, as proteínas das variantes de GS deste trabalho foram purificadas em coluna de níquel. As porções eluídas durante o processo foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE, confirmando as purificações das proteínas. A eletroforese em gel de poliacrilamida da purificação da GS-*gln* selvagem (expressa em meio com glutamina) está mostrada na Figura 7A, e da GS-N selvagem (expressa em meio com amônio) na Figura 7B. As mutantes H250R, L293R, P349L e G54C, nas duas formas de expressão (-N e -*gln*), também foram purificadas (dados não mostrados).

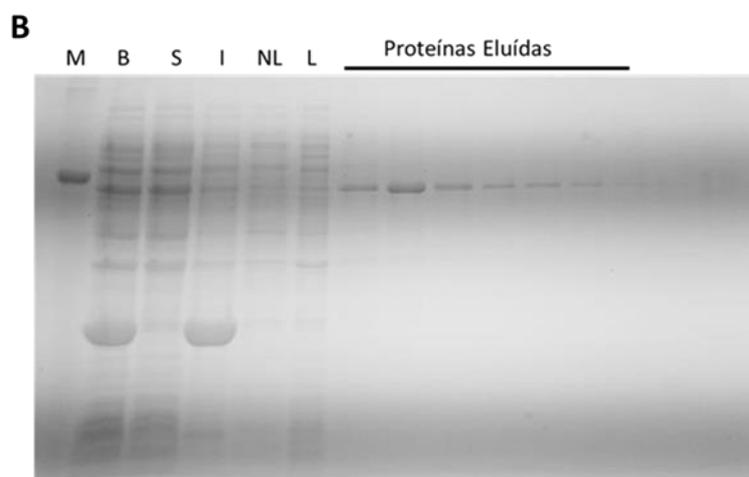
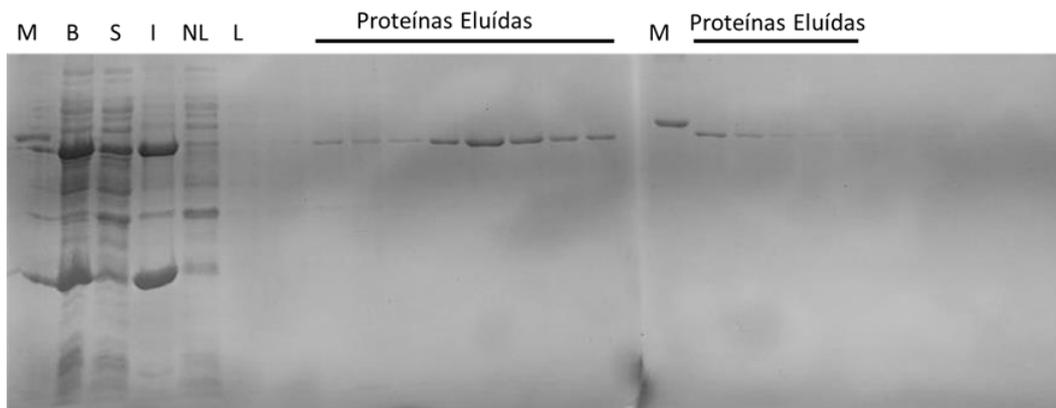


Figura 7 - Purificação da Proteína Glutamina Sintetase Selvagem. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% de purificação de proteínas por cromatografia de afinidade. O poço (M) contém o marcador Albumina bovina (BSA) com 66,5 KDa. O poço (B) contém o Extrato Bruto de proteínas das bactérias os poços (S) e (I) contém as frações solúveis e insolúveis do lisado celular, respectivamente. O poço (N.L) corresponde ao conteúdo não ligado à coluna e (L) à lavagem da coluna cromatográfica. A proteína purificada foi eluída. (A) GS-gln. (B) GS-N.

3.3 Caracterização das variantes da enzima GS purificadas

3.3.1 Atividade Biossintética

A caracterização da enzima GS de *E. coli* em várias condições mostraram que as formas adenililada e não modificada da proteína têm propriedades funcionais distintas, as quais são frequentemente usadas para inferir indiretamente o estado de modificação pós-traducional de preparações de GS. Entre essas propriedades diferenciais, a atividade biossintética da proteína GS adenililada é estritamente dependente de íons Mn^{2+} , enquanto a não modificada depende de íons Mg^{2+} (Kingdon et al, 1967). Para verificar o

estado de adenililação das preparações da GS desse trabalho, a atividade biossintética das mesmas foi testada na presença dos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} (Figura 8).

Os resultados da atividade da GS selvagem mostraram que as 2 preparações da GS selvagem (GS-N, GS-gln) parecem estar no estado não modificada, já que a atividade biossintética foi sempre maior na presença do íon Mg^{2+} . Ou seja, a condição de indução da GS na presença de amônio não foi capaz de estimular a adenililação da enzima superexpressa pela GlnE de *E. coli*, diferente do esperado, o que atrapalhou a interpretação dos resultados do experimento. De qualquer forma, para as variantes mutantes outros padrões de adenililação foram encontrados. As proteínas mutantes H250R e L293R parecem que foram parcialmente adenililadas nas versões expressas com amônio (H250R-N e L29R-N), já que a atividade biossintética na presença de Mg^{2+} aumentou na versão em relação às versões expressas com glutamina (H250R-gln e L293R-gln). Já variante P349L parece estar parcialmente adenililada em qualquer uma das duas versões de expressão (P349L-N e P349L-gln). A variante G54C, por sua vez, parece estar bastante adenililada tanto na forma expressa com amônio (G54C-N), quanto na expressa com glutamina (G54C-gln), sugerindo que é possível que essa mutação resulte em uma GS que é substrato constitutivo da ATase. No entanto, como os controles feitos com a GS selvagem não apresentaram o padrão de regulação esperado, as conclusões do experimento são limitadas.

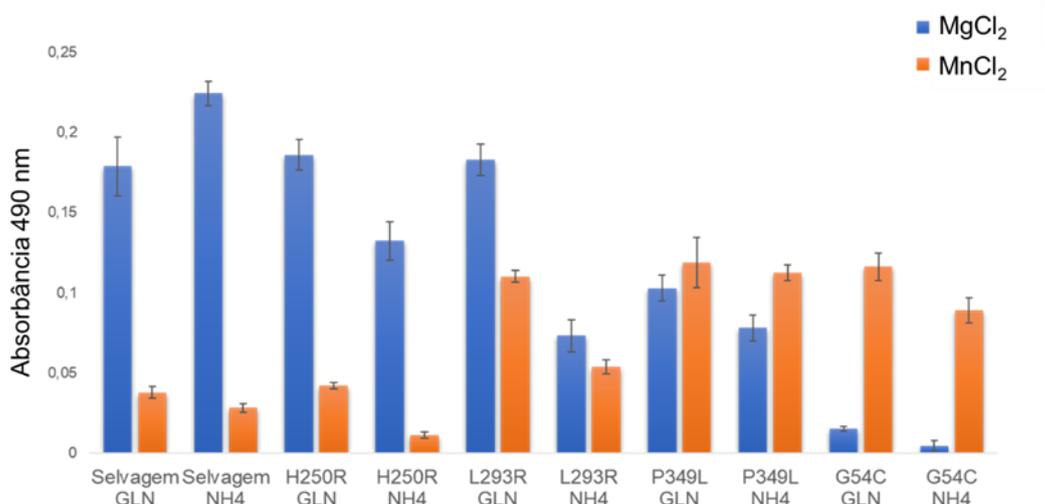


Figura 8. Reação Biossintética com $MgCl_2$ e $MnCl_2$. Em cada reação foi adicionado 5 μg de cada variante da enzima GS, as reações foram incubadas por 60 minutos a 37°C na presença de Magnésio (barras azuis) ou manganês (barras laranjas). Os dados representam

a média de 3 experimentos independentes, as barras de erro mostram o desvio padrão encontrado para cada média.

3.3.2 Reação γ -GT

Além da dependência do metal divalente na reação biossintética, diferenças nas propriedades das formas adenililada e não modificada da enzima GS quanto à atividade γ -GT também são comumente utilizadas para demonstrar o estado de modificação pós-traducional de preparações de GS. Ensaios de caracterização da atividade da enzima GS de *E. coli* em diversas condições demonstraram que a forma adenililada da enzima tem atividade γ -GT inibida por íons Mg^{+2} (Stadman et al, 1979). Dessa forma, nós testamos a atividade γ -GT das preparações de GS desse trabalho na presença ou ausência de íons Mg^{2+} . Os resultados estão mostrados no gráfico da Figura 9.

Os resultados com as duas formas da enzima GS selvagem testadas (GS-N, GS-gln) corroboram as conclusões das reações biossintéticas, já que o padrão de inibição por íons Mg^{2+} foi semelhante em todas elas, indicando que a expressão na presença de amônio não foi capaz de induzir a adenililação pela GlnE do hospedeiro. No caso das variantes mutantes, as proteínas H250R, L293R, e P349L aparentemente estão adenililadas quando expressas com amônio, e desadenililadas quando expressas em glutamina, indicando que a regulação da modificação dessas variantes parece ter obedecido ao modelo já anteriormente descrito. A variante G54C, por sua vez, parece estar totalmente adenililada nas duas condições de expressão. No caso das variantes H250R, G54C e L293R, os resultados da reação γ -GT corroboram aqueles encontrados com a reação biossintética (Figura 8), já que ambos sugerem um estado de adenililação das proteínas expressas com amônio, e não modificadas para as proteínas expressas com glutamina. No entanto para a variante P349L parece haver uma discrepância no resultado, e experimentos confirmatórios precisam ser executados.

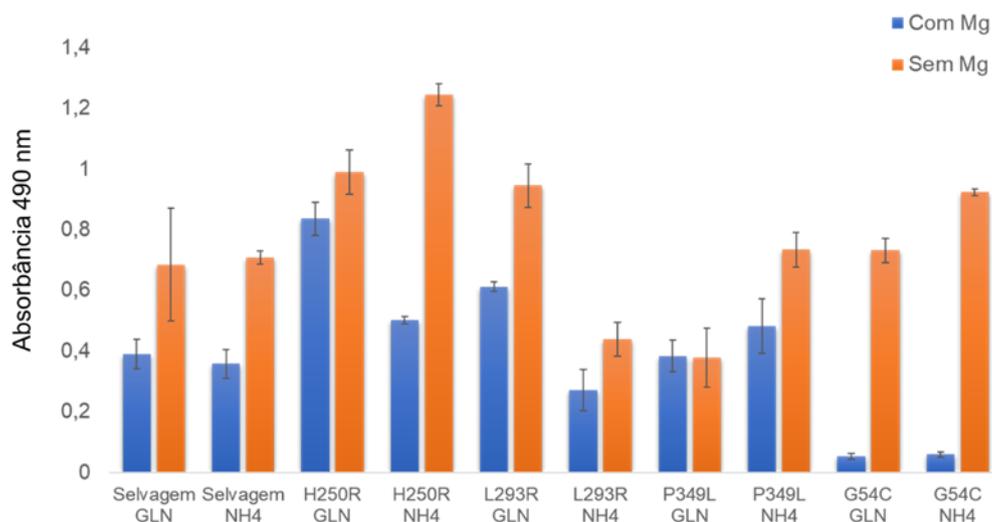


Figura 9. Reação γ -GT. Reação γ -GT com proteínas selvagem e variantes mutantes purificadas. Em cada reação foi adicionado 5 μ g de cada variante da enzima GS, as reações foram incubadas por 60 minutos a 37°C na presença (barras azuis) ou ausência de $MgCl_2$ (barras laranja). Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, as barras de erro mostram o desvio padrão encontrado para cada média.

3.3.3 Reação de Adenilação

Para explorarmos o mecanismo de regulação da modificação das variantes mutantes, nós realizamos reações de adenilação *in vitro* catalisada pela enzima GlnE de *H. seropedicae* purificada. Como substrato foram utilizadas as variantes de GS expressas em meio com glutamina, que resulta em uma GS não modificada. O resultado foi analisado pela análise da inibição da atividade γ -GT por íons Mg^{2+} e estão mostrados na Figura 10.

Os resultados das reações da adenilação *in vitro* sugerem que a GS selvagem e a variante H250R parecem ter sido adeniladas pela GlnE purificada, já que a atividade γ -GT aumentou na ausência de Mg^{2+} após a reação de adenilação. As variantes L293R e P349L, por sua vez, aparentemente não foram substrato para a reação ATase catalisada por GlnE *in vitro*. A variante G54C, como esperado, não sofreu qualquer alteração na atividade γ -GT induzida por adenilação, já que o perfil de atividade dessa variante parece ser de GS adenilada de forma constitutiva.

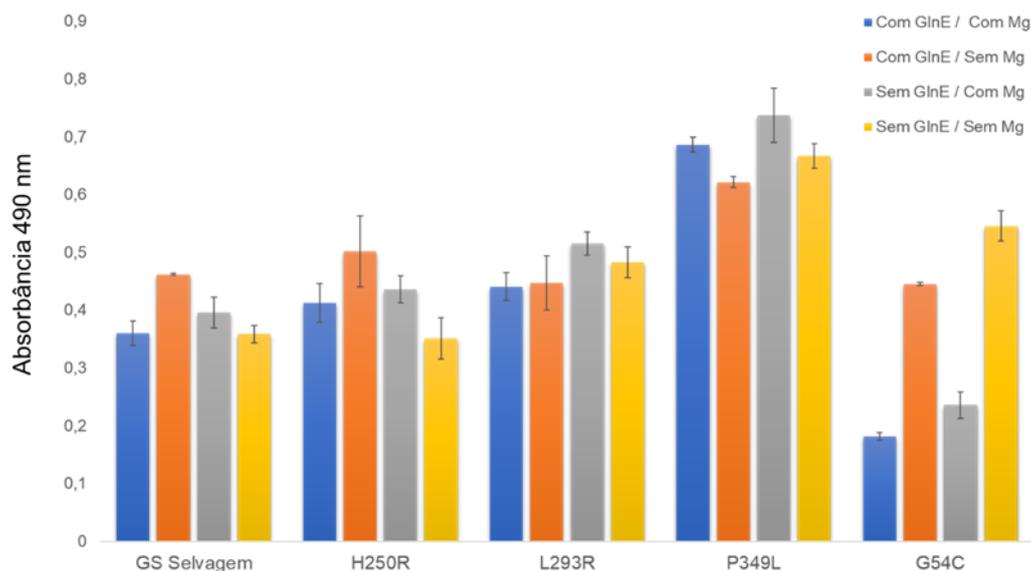


Figura 10. Adenilação *in vitro*. Adenilação das variantes de GS catalisadas pela GlnE (barras azuis e laranjas). Os controles sem GlnE são mostrados nas barras cinzas e amarelas. Em cada reação foi adicionado 5 μg de cada variante da enzima GS. Inicialmente as reações foram incubadas na presença ou ausência de 2 μg da enzima ATase por 60 minutos a 37°C, em seguida adicionou-se o mix γ -GT e as reações foram incubadas por 60 minutos a 37°C na presença ou ausência de MgCl_2 . Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, as barras de erro mostram o desvio padrão encontrado para cada média.

3.3.4 Reação de Desadenilação

Para a verificação do mecanismo de desadenilação *in vitro* de GS, nós optamos por utilizar uma variante truncada de GlnE de *H. seropedicae*, AR-GlnE, a qual contém apenas o domínio de desadenilação da enzima. O substrato para as reações de desadenilação foram as variantes de GS expressas em meio com amônio, que deveria resultar em uma GS adenilada, ao menos parcialmente. Os resultados são mostrados na Figura 11.

Os resultados indicam que a enzima AR-GlnE não foi capaz de mudar o padrão de inibição por íons Mg^{2+} da reação γ -GT da GS selvagem e das variantes H250R, P349L e G54C, mas foi capaz de desadenililar a variante L293R. No caso da GS selvagem e da variante P349L o padrão antes da incubação com a AR-GlnE já era de uma GS não modificada.

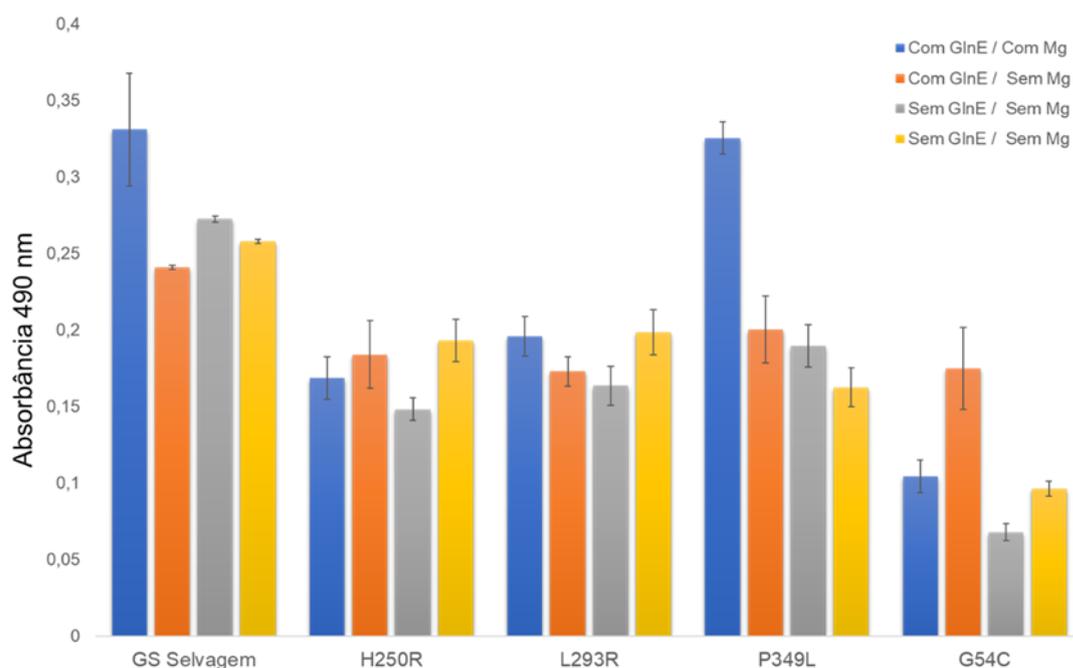


Figura 11. Desadenilação *in vitro*. Desadenilação das variantes de GS catalisadas pela AR-GlnE (barras azuis e laranjas). Os controles sem GlnE são mostrados nas barras cinzas e amarelas. Em cada reação foi adicionado 5 μg de cada variante da enzima GS, inicialmente as reações foram incubadas na presença ou ausência de 2 μg da enzima AR-GlnE por 60 minutos a 37°C, em seguida adicionou-se o mix γ -GT e as reações foram incubadas por 60 minutos a 37°C na presença ou ausência de MgCl_2 . Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, as barras mostram o desvio padrão encontrado para cada média.

3.5 Determinação de interações proteína-ligante usando fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

Uma das hipóteses para os fenótipos das variantes da enzima GS aqui encontrados é que as mutações analisadas poderiam alterar a ligação da GS aos seus diferentes ligantes, sejam substratos, produtos ou moléculas reguladoras. Para testar a ligação de ligantes em GS, nós utilizamos a técnica de fluorimetria de varredura diferencial (DSF). Essa técnica se baseia no aumento da estabilidade da estrutura tridimensional de proteínas quando ligadas aos seus ligantes. No DSF, a proteína é aquecida, com ou sem ligante, na presença de um corante fluorescente específico para resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de proteínas, e a fluorescência é quantificada em tempo real durante a rampa de aquecimento. Quando a solução atinge uma temperatura na qual a proteína globular desnatura, os aminoácidos hidrofóbicos do núcleo da estrutura são expostos, aumentando a fluorescência. Essa técnica permite a determinação da temperatura média de desnaturação da proteína (T_m). Na presença de um ligante, a formação do complexo proteína-ligante aumenta a estabilidade da proteína, que é refletida por um aumento na T_m . Dessa forma, o aumento da estabilidade é proporcional à fração proteica que está

formando um complexo com o ligante, permitindo que a ligação seja caracterizada indiretamente. Aqui, nós utilizamos o DSF para demonstrar a ligação de ATP, ADP, glutamato e glutamina às variantes de GS do estudo.

3.5.1 Ligação de ATP e ADP às variantes de GS

A Figura 12 traz o dado representativo de um experimento, mostrando a leitura normalizada da fluorescência e a curva derivada. O ponto mínimo do vale da curva derivada corresponde ao T_m (Figura 12B). Esses dados foram usados para construir as curvas que relacionam a variação da T_m pela concentração de ligante, mostrado na Figura 13. Os resultados indicam que tanto ATP quanto ADP, com igual afinidade, foram capazes de ligar em ambas as preparações da enzima GS selvagem. Os resultados indicam ainda que a afinidade de ambos os nucleotídeos parece ser a mesma na GS-N e GS-gln, sugerindo que as diferenças na atividade catalítica não se devem a diferenças na afinidade pelos ATP e ADP (Figura 12A).

Para verificar se nós estávamos observando ligação de ATP e ADP no mesmo sítio da GS, nós fizemos o DSF da ligação de ADP utilizando GS saturada com ATP. O resultado está mostrado na Figura 14. A curva de ligação demonstra claramente que o ADP não foi capaz de se ligar a GS quando concentrações saturantes de ATP estavam presentes, mostrando que esses dois ligantes de fato competem pelo mesmo sítio de ligação.

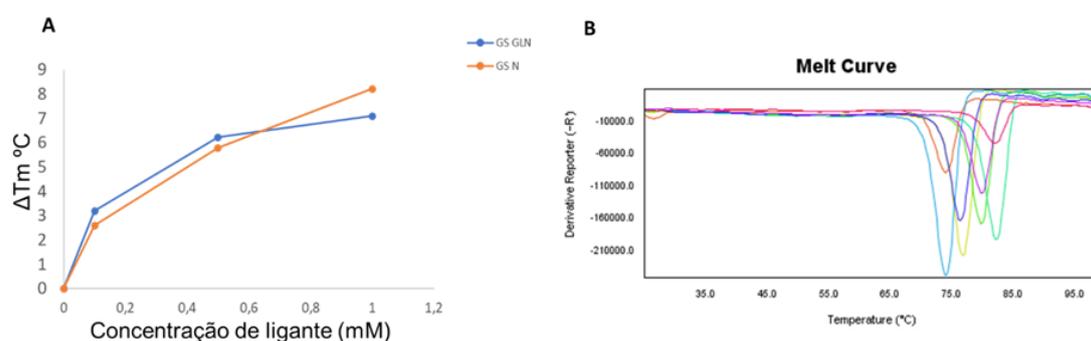


Figura 12. Curva de Melting Glutamina Sintetase Gln e N. A. Curva de ΔT_m da ligação do ATP em GS-gln e GS-N. **B.** Curva de Melting derivada da Glutamina Sintetase e o ligante ATP. Nas reações foram utilizadas 5 μ g de proteína GS, 4 μ l tampão de interação $MgCl_2$ 5x, 1 μ l corante SYBR Orange 100x e concentrações variadas de ligante para avaliar a ligação entre a GS Gln e GS-N e o ATP.

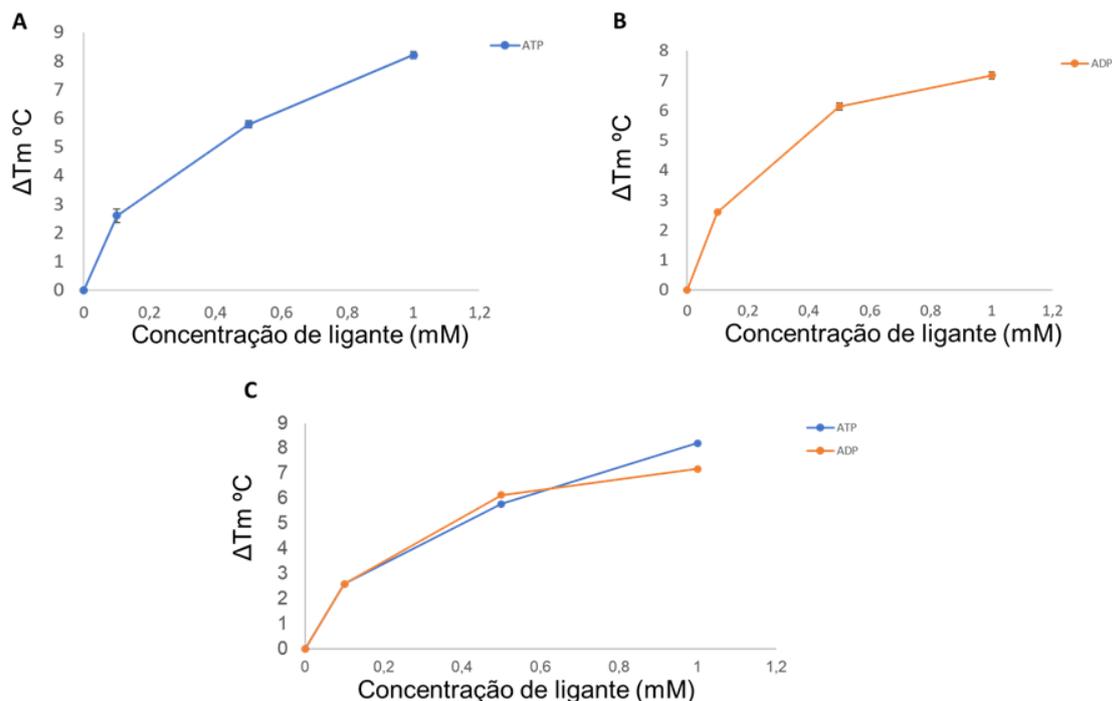


Figura 13 – Ligação de ATP e ADP à GS selvagem. A. Ligação de ATP em GS-N B. Ligação de ADP em GS-N C. Comparação das curvas de ligação de ATP e ADP a GS-N. Em cada reação foi utilizado 5 μg de proteína GS, 4 μl tampão de interação MgCl_2 5x, 1 μl corante SYBR Orange 100x e concentrações variáveis de ligante para avaliar a ligação entre a GS e moléculas ATP e ADP.

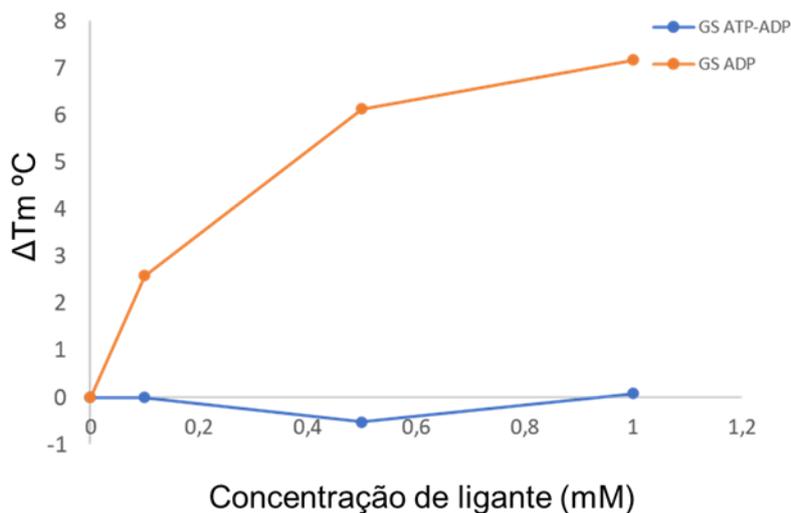


Figura 14. Ligação de ADP em GS-N saturada com ATP. Nas reações foram utilizadas 5 μg de proteína GS, 4 μl tampão de interação MgCl_2 5x, 1 μl corante SYBR Orange 100x, concentrações variadas de ADP, e na curva azul 2 mM do ligante ATP.

Uma vez determinadas as condições para verificação da ligação de ligantes à proteína GS por DSF, nós utilizamos a técnica para verificar a ligação de ATP e ADP às

variantes mutantes de GS estudadas nesse trabalho. Os resultados estão mostrados na Figura 15 indicam que a variante H250R liga-se ao ATP e ADP de forma semelhante a GS selvagem. As variantes mutantes L293R e P349L possuem afinidade menor pelo ATP e pelo ADP em relação a GS selvagem, enquanto a variante G54C aparentemente não foi capaz de ligar ATP e ADP nas condições testadas.

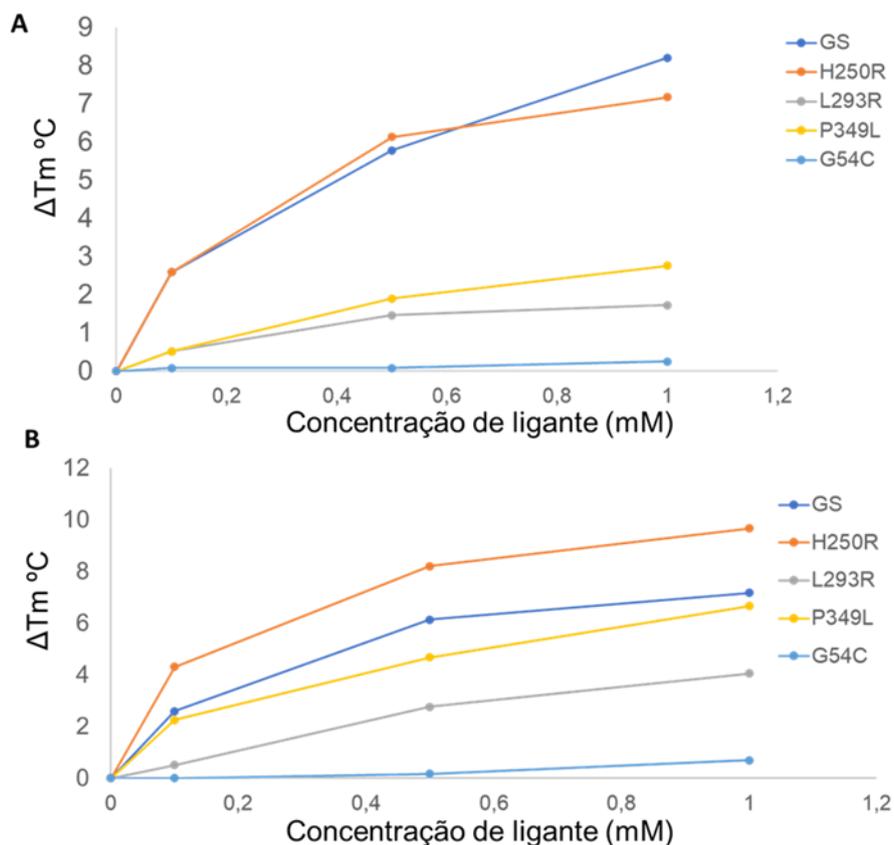


Figura 15 Ligação de ATP e ADP à GS selvagem e mutantes A. Curva de ligação do ATP **B.** Curva de ligação do ADP. Nas reações foram utilizadas 5 μ g de proteína GS, 4 μ l tampão de interação $MgCl_2$ 5x, 1 μ l corante SYBR Orange 100x e concentrações variadas do ligante ATP ou ADP.

A ausência de ligação de ATP pelo mutante G54C em tampão contendo íons Mg^{2+} possivelmente explica a ausência de atividade enzimática dessa variante na presença de $MgCl_2$ (Figuras 8 e 9). No entanto, esses experimentos indicaram que quando íons Mn^{2+} estavam presentes, essa variante enzimática apresentou atividade. Por isso, nós procuramos verificar se a variante mutante G54C era capaz de ligar ATP e ADP na presença de íons Mn^{2+} . Os resultados apresentados na Figura 16 indicam que de fato a mutação G54C provocou uma perturbação no sítio de ligação de nucleotídeo de tal forma

que impediu a entrada de MgATP, mas com a possibilidade da coordenação de MnATP, explicando o fenótipo de atividade enzimática peculiar encontrado nos experimentos anteriores com esse mutante, os quais haviam sido erradamente interpretados como adenililação constitutiva.

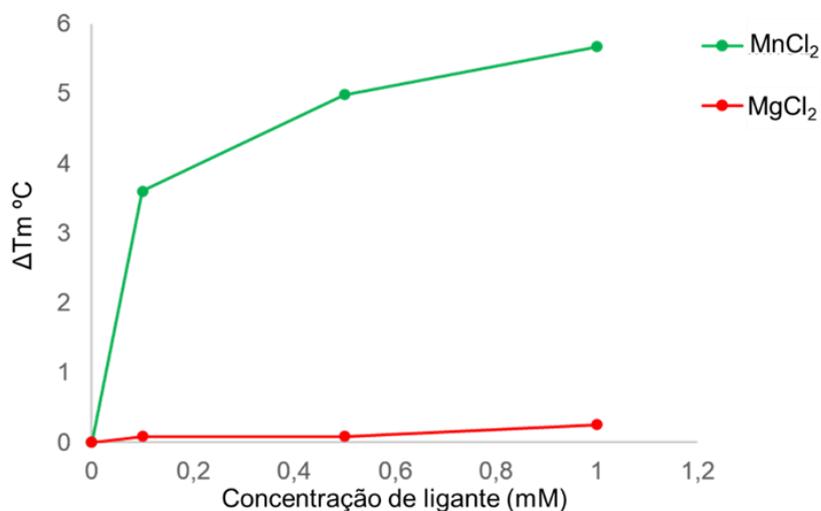


Figura 16. Ligação de ATP à GS G54C utilizando tampão MnCl₂ e MgCl₂. Nas reações foram utilizadas 5 μg de proteína GS da variante mutante G54C, 1 μl corante SYBR Orange 100x, concentrações variadas do ligante ATP e tampão de interação 5x composto por 25 mM de MgCl₂ ou 5 mM de MnCl₂, conforme indicado.

3.5.2 Ligação de glutamato e glutamina às variantes de GS

Além de nucleotídeos, o sítio ativo da enzima GS é capaz de se ligar ao substrato glutamato (na reação biossintética) ou ao substrato glutamina (na reação γ -GT). Para estudar a interação desses substratos com as variantes de GS desse estudo, nós utilizamos DSF conforme mostrado nas Figuras 17 e 18. Os resultados indicam que tanto glutamato, quanto glutamina, não são capazes de se ligar à GS, exceto quando da prévia saturação de GS com ATP. Esses resultados indicam que o sítio de ligação de glutamato ou glutamina só se forma com a prévia ligação de ATP. As conclusões aqui apresentadas contrariam a previsão feita anteriormente por estudos espectroscópicos que sugeriam que Glutamato e ATP ligariam em GS em uma ordem aleatória (Rhee et al, 1981).

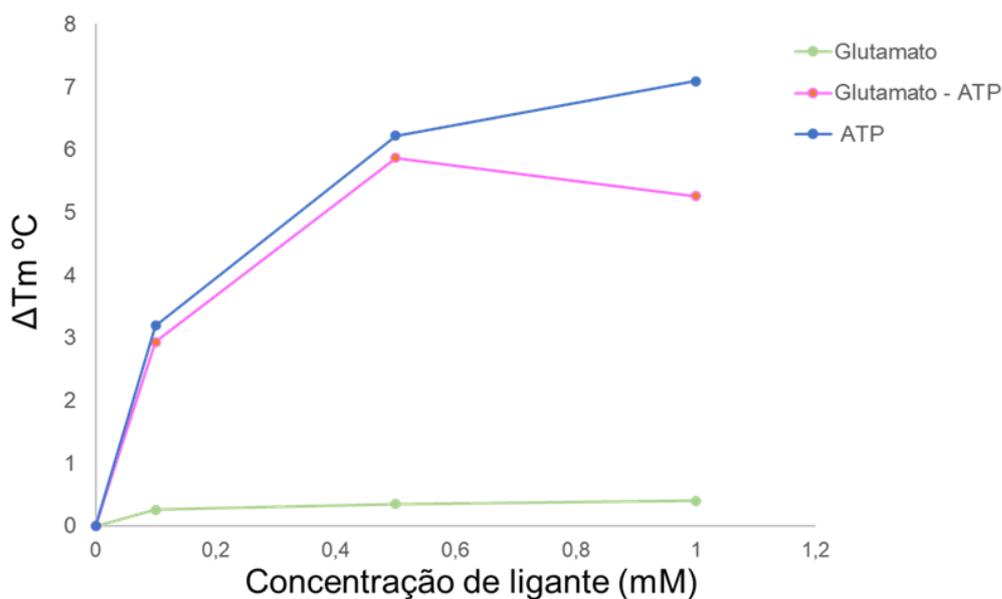


Figura 17. Ligação do Glutamato e do ATP a GS-N. Ligação do glutamato a GS-N em verde e em azul a ligação do ATP a GS-N. Nas reações foram utilizadas 5 μ g de proteína GS, 4 μ l tampão de interação $MgCl_2$ 5x, 1 μ l corante SYBR Orange 100x e concentrações variadas do ligante ATP e Glutamato. Em rosa, a ligação do glutamato à GS-N saturada com ATP, foram utilizadas concentrações variadas de ATP para incubação e 2 mM do ligante glutamato.

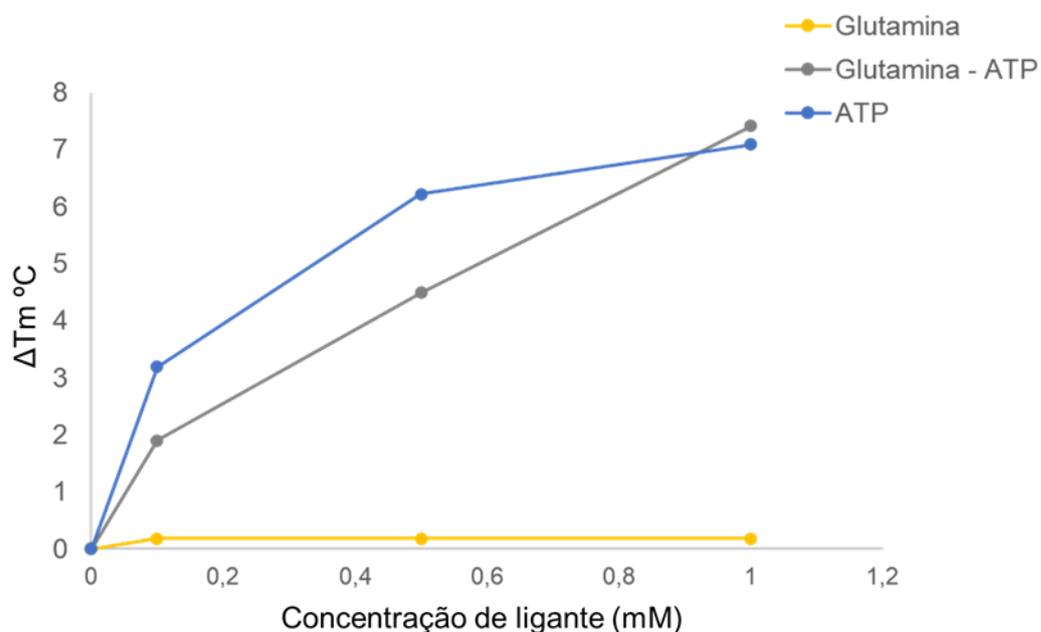


Figura 18. Ligação da Glutamina e ATP a GS-N. Ligação da glutamina a GS-N em amarelo e em azul a ligação do ATP. Nas reações foram utilizadas 5 μ g de proteína GS, 4 μ l tampão de interação $MgCl_2$ 5x, 1 μ l corante SYBR Orange 100x e concentrações variadas do ligante ATP e Glutamina. Em cinza, a ligação da glutamina à GS-N saturada

com ATP, foram utilizadas concentrações variadas de ATP para incubação e 2mM da ligante glutamina.

Nós também testamos se o ADP era capaz de substituir ATP na formação do sítio ativo de glutamina e glutamato. Os resultados mostrados na Figura 19 indicam a ligação prévia de ADP também é capaz de formar o sítio de ligação de glutamato e glutamina, de modo semelhante ao ATP.

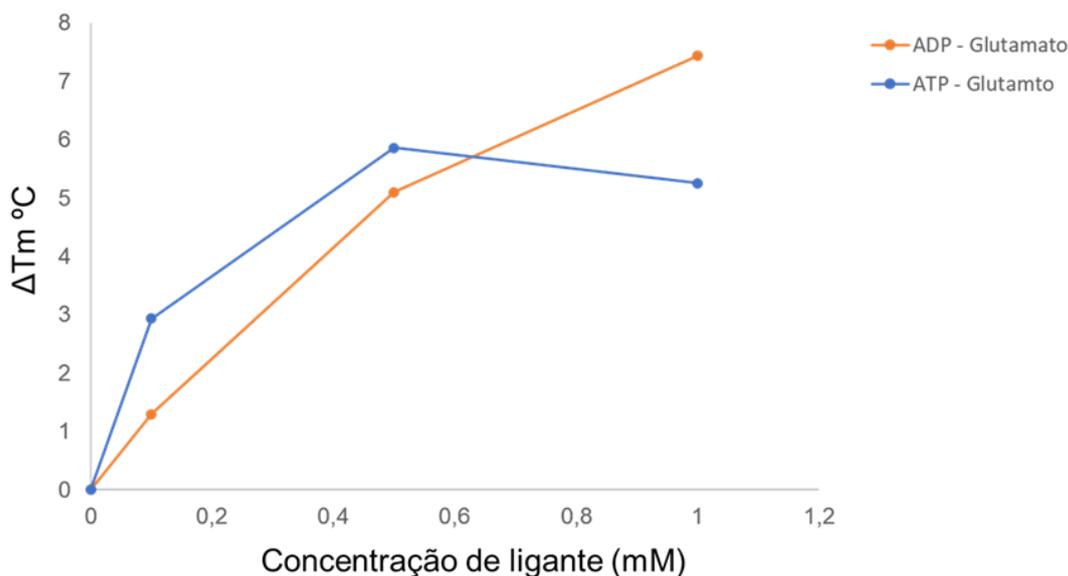


Figura 19. Ligação de glutamato em GS-N saturada com ATP e ADP. Nas reações foram utilizadas 5 μg de proteína GS, 4μl tampão de interação MgCl₂ 5x, 1μl corante SYBR Orange 100x, concentrações variadas de ATP e ADP, e 2 mM do ligante glutamato.

Nós também utilizamos o DSF para verificar a interação de glutamato com as variantes mutantes de GS saturadas com ATP, e os resultados estão mostrados na Figura 20. Dessa forma, podemos observar que as variantes mutantes H250R, L293R e P349L parecem ligar o glutamato com menor afinidade do que a proteína selvagem. A variante G54C, por sua vez, não foi capaz de ligar o glutamato, presumidamente por não ter ligado ATP, já que o experimento foi feito na presença de íons Mg²⁺. O mesmo experimento será repetido na presença de Mn²⁺ para que a ligação do glutamato possa ser observada.

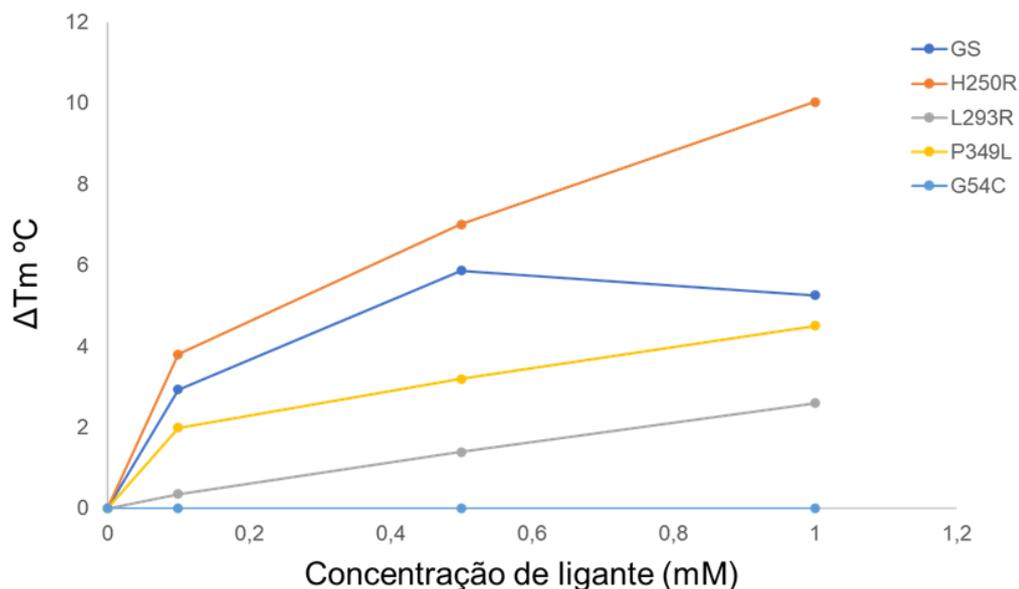


Figura 20. Ligação do Glutamato à GS selvagem e mutantes. Nas reações foram utilizadas 5 μ g de proteína GS, 4 μ l tampão de interação $MgCl_2$ 5x, 1 μ l corante SYBR Orange 100x, concentrações variadas de ATP, e 2 mM do ligante glutamato.

3.6 Modelagem computacional

O modelo na forma monomérica da estrutura tridimensional da proteína Glutamina Sintetase de *Herbaspirillum seropedicae* foi obtido por modelagem molecular por homologia. Dentre os 500 modelos gerados pelo programa Modeller, foram ranqueados os 10 melhores a função do DOPE score. A partir do gráfico de estereoquímica (Figura 21) foi avaliado o modelo final. Por meio da ferramenta de sobreposição do programa Coot (Krissinel et al., 2004), utilizando o molde 1F52 foi gerado o modelo dodecamérico (Figura 22).

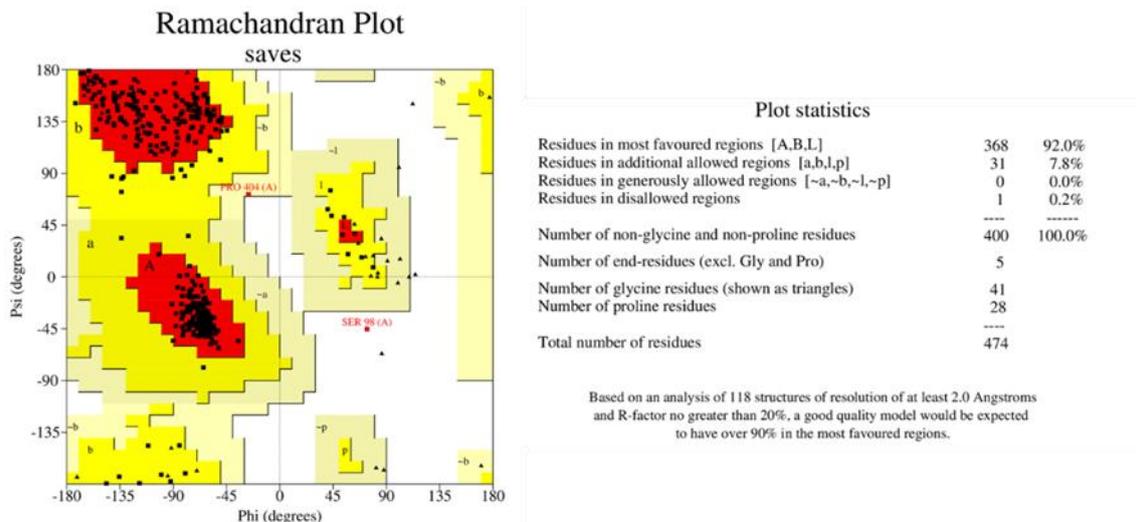


Figura 21. Avaliação do Modelo construído. Gráfico Ramachandran do modelo computacional da estrutura tridimensional de GS.

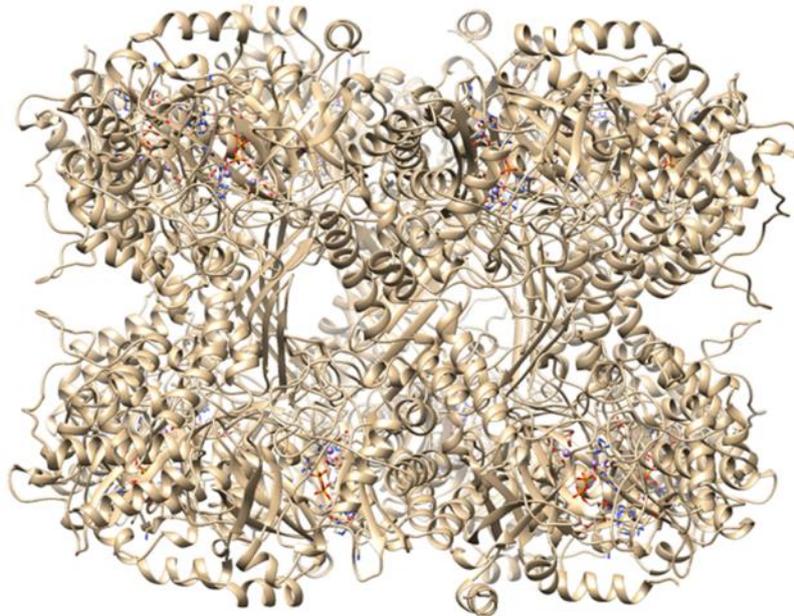


Figura 22. Modelo dodecamérico da estrutura tridimensional da Glutamina Sintetase de *H. seropedicae*.

Uma vez construído o modelo da enzima, os aminoácidos que foram mutados pontualmente no presente trabalho foram mapeados na estrutura. Os resultados indicam que as mutações G130S, L293R e P349L estão muito próximas ao sítio de ligação dos nucleotídeos ATP ou ADP, com grande potencial para interferir na atividade catalítica da enzima (Figura 23).

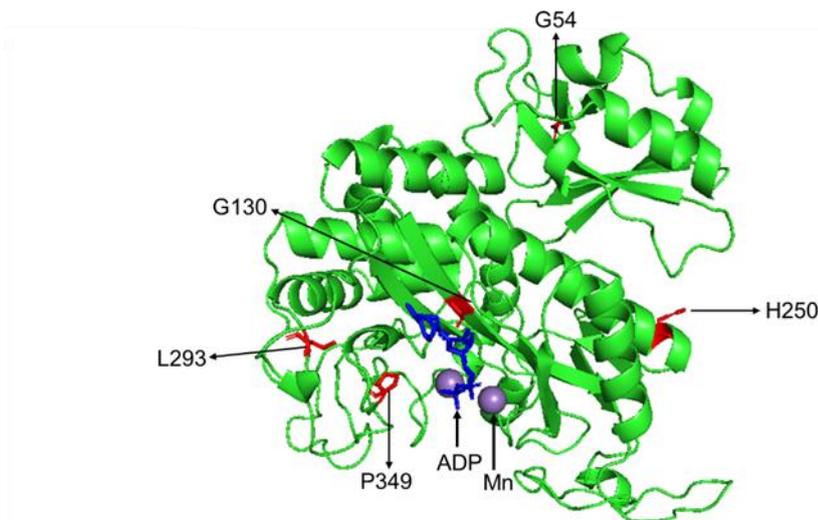


Figura 23. Modelo computacional da estrutura monomérica da Glutamina Sintetase demonstrando a posição dos aminoácidos mutagenizados na enzima em relação ao sítio de ligação de nucleotídeos. Nesta Figura, os resíduos de aminoácidos que foram mutagenizados são representados em vermelho, a molécula ADP é representada em azul e os cofatores Mn^{2+} são representados em roxo.

O resíduo G54 encontra-se relativamente afastado do sítio de ligação do nucleotídeo na subunidade em que o aminoácido se encontra, porém a partir de um modelo computacional do dodecâmero, podemos perceber que o resíduo G54 encontra-se próximo ao sítio de ligação do ATP da subunidade adjacente (Figura 24), possivelmente causando uma alteração na estrutura ou até mesmo na afinidade pela molécula.

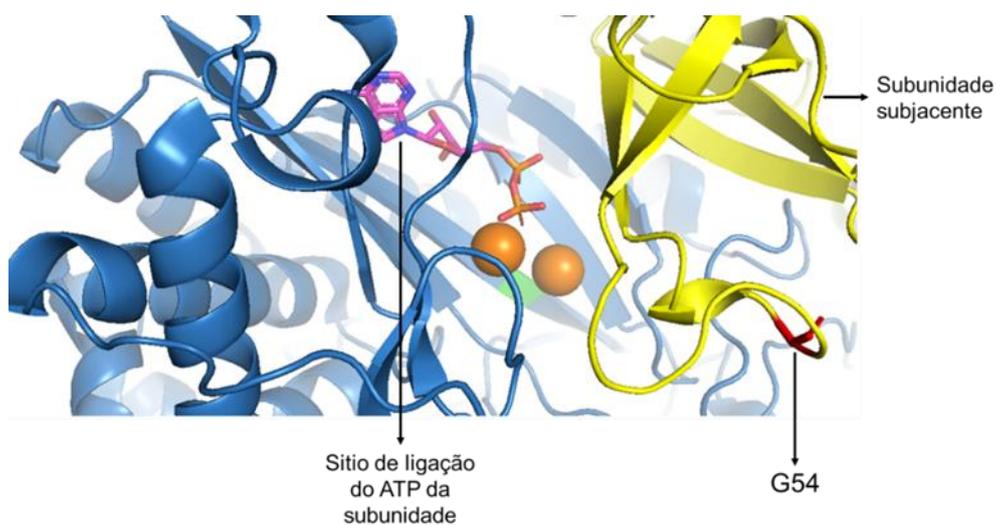


Figura 24. Localização do resíduo G54 no dodecâmero de GS. Modelo da estrutura tridimensional da enzima demonstrando a localização da posição 54 próxima ao sítio de ligação do ATP e dos metais cofatores da subunidade adjacente.

4. Discussão

A regulação do metabolismo de nitrogênio das bactérias é fortemente dependente da regulação da atividade da enzima GS, a primeira da via de assimilação de amônio. O metabolismo bacteriano é regulado para manter uma homeostase da concentração dos principais metabólitos doadores de grupos amino para as reações biossintéticas: o glutamato e a glutamina (Schumacher et al, 2013). Assim, condições bastante diversas de disponibilidade de nitrogênio no meio não devem resultar em grandes variações na concentração intracelular desses metabólitos. Dentro desse contexto, mutações que alterem de alguma forma a regulação da atividade da enzima GS podem causar grandes perturbações metabólicas na célula, dando origem a fenótipos pleiotrópicos de difícil previsão. Embora o mecanismo bioquímico ainda não esteja esclarecido, essa é possivelmente a racionalização dos fenótipos de fixação biológica de nitrogênio constitutiva encontrada em mutantes espontâneos da bactéria *A. brasilense* (Machado et al, 1991). Como temos interesse tanto em compreender o fenômeno metabólico desencadeado por essas mutações, bem como em construir estirpes da bactéria *H. seropedicae* super fixadoras de nitrogênio, nós decidimos reproduzir as mutações encontradas naquele trabalho com *A. brasilense* na GS de *H. seropedicae* para realizar estudos *in vitro*. Para os estudos *in vitro* as proteínas mutantes ativas foram expressas de forma recombinante em sistema heterólogo.

Quimicamente, na mutação H250R, o aminoácido Histidina foi substituída por Arginina, que se caracterizam por possuírem grupo radical (R) carregados positivamente e são hidrofílicos, indicando que esta mutação no gene trocou aminoácidos com características semelhantes, além de que, a posição 250 na proteína, encontra-se fora do sítio ativo em questão, tornando esta variante com o fenótipo mais parecido com a selvagem. Em L293R o aminoácido Leucina é trocado por Arginina: a leucina possui Grupo R apolar, alifático e tende a se agrupar no interior de proteínas, estabilizando a estrutura por meio de interações hidrofóbicas e a arginina possui grupo R carregado positivamente e é hidrofílico, este fator pode estar interferindo na conformação das ligações ao redor na estrutura proteica (Nelson e Cox, 2014). Na variante P349L, substituímos uma prolina de cadeia lateral alifática com estrutura cíclica, onde o grupo imino é mantido em configuração rígida e reduz a flexibilidade estrutural por Leucina ,

que tem o Grupo R apolar, alifático e tende a se agrupar no interior de proteínas, estabilizando a estrutura por meio de interações hidrofóbicas, assim como a mutação em G54C, em que, muda-se a Glicina de estrutura muito simples e apolar pelo aminoácido cisteína com grupos sulfidrilas (Nelson e Cox, 2014). Isso possivelmente explica o fenótipo divergente da proteína selvagem *in vitro*.

Nós investigamos a atividade enzimática das versões adenililada e não modificada das variantes enzimáticas, e procuramos fazer a adição e a remoção dos grupamentos AMP utilizando a GlnE purificada. Os resultados indicaram que todas as enzimas foram purificadas em suas formas ativas. Sobre a regulação pós-traducional, os resultados indicam que a variante H250R parece ser adenililada e desadenililada por um mecanismo semelhante a selvagem. Sobre os mutantes L293R e P349L, os diferentes experimentos aqui realizados são discrepantes e não conclusivos. Esses experimentos indiretos indicaram que a variante G54C parecia estar constitutivamente adenililada, no entanto os experimentos de interação indicaram que essa proteína não é capaz de interagir com ATP ou ADP na ausência de Mn^{2+} , o que levou a uma dificuldade na interpretação dos resultados dessa variante. De modo geral, a análise criteriosa dos nossos dados indica que ainda carecemos de um método para visualizar diretamente a modificação pós-traducional, apenas os métodos funcionais indiretos que foram aqui utilizados aparentemente não serão suficientes para que conclusões mais precisas possam ser tiradas, especialmente quando trabalhamos com as variantes mutantes que podem ter um comportamento muito diferente da GS selvagem nesses experimentos. Para esse fim, nós estamos tentando padronizar análises de espectrometria de massas que permitam diferenciar a versão modificada da versão não modificada da enzima.

A ligação de ATP, ADP, glutamato e glutamina em GS é importante, tanto porque essas moléculas podem servir como substratos das reações biossintética e γ -GT, quanto porque são reconhecidamente moléculas reguladoras da atividade de GS. Para avaliar a ligação desses ligantes à enzima, realizamos a determinação de interações proteína-ligante usando fluorimetria de varredura diferencial (DSF) e podemos avaliar que enzima tem afinidade pelo ATP e também pelo ADP (Figura 13A e 13B). Os dados indicam que ATP e ADP ligam com igual afinidade a GS (Figura 13C), e aparentemente não há diferenças na afinidade por esses ligantes entre a proteína modificada ou não modificada (Figura 12A). Porém quando incubamos GS com o ATP inicialmente e logo após realizamos a ligação com o ADP, podemos perceber que o mesmo não se liga, demonstrando que ambos possuem o mesmo sitio de ligação (Figura 14).

A variante mutante H250R se ligou ao ATP e ADP de forma muito parecida a selvagem, enquanto as variantes L293R e P349L parecem ter ligado com menor afinidade (Figura 15). A variante G54C, por sua vez, só é capaz de ligar ATP na presença de íons Mn^{2+} (Figura 16). A Figura 20 mostra que assim como a GS selvagem, as variantes mutantes também se ligam ao glutamato após a incubação prévia da enzima com o ATP.

Os resultados mostram que as modificações na enzima GS, promoveram alterações que variam de acordo com a posição do aminoácido substituído, levando a observações importantes sobre modificações que ocorrem nos mecanismos de regulação da assimilação do amônio em *Herbaspirillum seropedicae*.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento CAPES e CNPq, ao COMCAP, à Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Bioquímica e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Referências

- ALMASSY, R.J.; JANSON, C.A.; HAMLIN, R.; XUONG, N.H.; EISENBERG, D. Novel Subunit-Subunit Interactions in the Structure of Glutamine Synthetase. **Nature**, v. 323, p. 304-309, 1986.
- ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 77, n. 3, 2005.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BÁSTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.**, v. 24, p. 7-11, 1998.
- BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BULEN, W.A.; LECOMTE, J.R. The Nitrogenase System of *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution and ATP-hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 56, p. 979-986, 1966.
- de ZAMAROCZY, M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 449-463, 1998.
- de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMER, K. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4143-4149, 1996.
- HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 75, p. 2699-2702, 1978.

HUNT, J.B.; SMYRNIOTS, P.Z.; GINSBURG, A.; STADTMAN, E.R. Metal ion requirement by glutamine synthetase of *Escherichia coli* in catalysis of 7-glutamyl transfer. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 166, p. 102-124, 1975.

JAGGI, R.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; OLLIS, D.L.; VASUDEVAN S.G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**, v. 16, p. 5562-5571, 1997.

JAGGI, R.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; OLLIS, D.L.; VASUDEVAN S.G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**, v. 16, p. 5562-5571, 1997.

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

Krissinel, E.; Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. **Acta Crystallographica.**, D60, p. 2256-2268, 2004.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 549-553, 1991.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. Ed, Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOINDORF, L.; BONATTO, A. C.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; & CHUBATSU, L. S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiology**, 11(1), 1–8, 2011.

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

PANKIEVICZ, V.C.; do AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.; AGTUCA, B.; SCHUELLER, M.J.; ARISI, A.C.; STEFFENS, M.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; STACEY, G.; FERRIERI, R.A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant J.**, v. 81, p. 907-919, 2015.

PERSHUN, D.C.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 192, p. 217-221, 2000.

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

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

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

SCHÄFER, A.; TAUCH, A.; JÄGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, 145(1), 69-73, 1994

SCHUMACHER, J.; BEHRENDTS, V.; PAN, Z., BROWN; D. R., HEYDENREICH; F., LEWIS; M. R.; BUCK, M. Nitrogen and Carbon Status Are Integrated at the Transcriptional Level by the Nitrogen Regulator NtrC In Vivo. **mBio**, v. 4(6), 2013.

SHAPIRO, B.M.; STADTMAN, E.R. 5'-adenylyl-O-tyrosine. The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 3769-3771, 1968.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O., RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, 146(6), 1407-1418, 2000.

van HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; BOOGERD, F.C. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, p. 628-695, 2013.

WOOLFOLK, C.A.; STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase. III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 118, p. 736-755, 1967.

Capítulo II

Artigo:

**CONSTRUÇÃO DE UMA ESTIRPE MUTANTE de *Herbaspirillum seropedicae*
NO GENE *glnA***

**CONSTRUÇÃO DE UMA ESTIRPE MUTANTE de *Herbaspirillum seropedicae*
NO GENE *glnA***

Ana Paula Alves dos Santos Silva¹; Marco Aurélio Schuler de Oliveira¹

1 Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica – Maringá, Paraná, Brasil

Autor correspondente:

Avenida Colombo 5790 – BAIRRO: ZONA 07; CIDADE: MARINGÁ; UF: PR CEP.: 87020-90

Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Bioquímica - Bloco I89- SALA 015

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a tese foi redigida na forma de artigo a ser submetido ao periódico *FEMS Microbiology Letters* com modificações para facilitar o entendimento do texto e para obedecer aos critérios estabelecidos pelas resoluções vigentes do programa de pós-graduação.

Resumo

A fixação do Nitrogênio consiste na redução do nitrogênio atmosférico a amônio por um pequeno grupo de procariotos, chamados diazotróficos. A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio. Uma das vias de assimilação do amônio é a da Glutamina Sintetase (GS), nesta via, o glutamato é aminado à glutamina, que tem seu grupo amida transferido para o 2-OG para formar duas moléculas de glutamato. Em estudos anteriores, foram encontradas estirpes mutantes da bactéria *Azospirillum brasilense* capazes de excretar amônio e fixar nitrogênio constitutivamente, não sendo inibidas por altas concentrações de amônio, como a estirpe selvagem. Esses e outros fenótipos encontrados nas estirpes mutantes foram atribuídos a mutações pontuais no gene *glnA*, que codifica a enzima GS, ou em sua região promotora. Esses resultados sugerem que o conhecimento do mecanismo de regulação da atividade de GS de *H. seropedicae* pode sugerir formas de manipular geneticamente a bactéria com o objetivo de gerar estirpes capazes de fixação de nitrogênio de forma constitutiva e, conseqüentemente, de excretar amônio. O presente estudo teve como objetivo construir uma estirpe da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* com mutação pontual no gene *glnA*, expressando uma variante mutante de GS a partir do DNA cromossomal para estudos *in vivo*.

Palavras-chave: Glutamina Sintetase, Recombinação Homóloga, Fixação de Nitrogênio

Abstract

Nitrogen fixation consists of the reduction of atmospheric nitrogen to ammonium by a small group of prokaryotes, called diazotrophs. The preferred source of nitrogen in bacteria is ammonium. One of the pathways of ammonium assimilation is that of Glutamine Synthetase (GS), in this pathway, glutamate is aminated to glutamine, which has its amide group transferred to 2-OG to form two glutamate molecules. In previous studies, mutant strains of *Azospirillum brasilense* bacteria have been found that are able to excrete ammonium and fix nitrogen constitutively, and are not inhibited by high concentrations of ammonium like the wild-type strain. These and other phenotypes found in the mutant strains were attributed to point mutations in the *glnA* gene, which encodes the GS enzyme, or in its promoter region. These results suggest that knowledge of the mechanism of regulation of GS activity of *H. seropedicae* may suggest ways to genetically manipulate the bacterium with the aim of generating strains capable of constitutive nitrogen fixation and, consequently, of excreting ammonium. The present work aimed to construct a strain of the *Herbaspirillum seropedicae* bacterium with point mutation in the *glnA* gene, expressing a mutant variant of GS from chromosomal DNA for *in vivo* activities.

Key words: Glutamine Synthetase, Homologous recombination, *glnA*, Nitrogen fixation

1. Introdução

1.1 Importância da fixação biológica de nitrogênio

A fixação do Nitrogênio é uma parte importante do ciclo bioquímico deste elemento. Ela consiste na redução do nitrogênio atmosférico a amônio por um pequeno grupo de procariotos, chamados diazotróficos (Dixon and Kahn, 2004). Organismos diazotróficos podem converter nitrogênio atmosférico, altamente estável, em moléculas mais reativas contendo nitrogênio, as quais estão disponíveis para outros seres vivos. Fazendo isso, os diazotrofos repõem o nitrogênio na biosfera perdido pela desnitrificação. Além desta importância ambiental, a fixação biológica do nitrogênio também é muito importante para a agricultura. O Nitrogênio é geralmente o fator limitante para a produtividade das culturas agrícolas, justificando a grande demanda por fertilizantes nitrogenados na agricultura. Uma alternativa para a fertilização nitrogenada é a inoculação das culturas com bactérias fixadoras de nitrogênio que podem promover um aumento na produtividade. Várias bactérias promotoras de crescimento de plantas já foram descritas. Este grupo de bactérias inclui as de vida livre, aquelas que estabelecem relações simbióticas específicas com as plantas e aquelas que podem colonizar a superfície e os tecidos internos das plantas, assim chamadas endofíticas (Glick, 2012). As bactérias promotoras de crescimento de plantas mais amplamente utilizadas como inoculante vegetal são as bactérias rizóbios, tal como *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. Estas bactérias formam nódulos nas raízes de plantas da família Fabaceae (leguminosas). Tais nódulos são estruturas únicas da planta para hospedar as células dos rizóbios, que se especializam para formar bacterióides. O ambiente do nódulo é otimizado para fixação do nitrogênio, e o nitrogênio fixado desta forma é incorporado na biomassa da planta. Estima-se que a economia com fertilizantes nitrogenados atribuída ao uso de rizóbios em soja no Brasil seja em torno de US\$ 3 bilhões por ano (Alves et al, 2003). Apesar de a inoculação de culturas com bactérias rizóbios ser uma tecnologia amplamente empregada, as culturas de gramíneas não podem ser beneficiadas com ela. Isto porque nodúlos de rizóbios são formados exclusivamente em raízes de leguminosas. Como as gramíneas estão entre as principais culturas vegetais no mundo, o desenvolvimento de um inoculante com bactérias promotoras de crescimento de vegetal para essas plantas teria um gigantesco interesse ambiental e econômico. Em tal perspectiva, muitas bactérias diazotróficas endofíticas, capazes de colonizar tecidos

internos de gramíneas têm sido isoladas e caracterizadas. Este grupo inclui a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*.

1.2 Assimilação do nitrogênio

A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio, o qual é combinado com o esqueleto carbônico do 2-oxoglutarato (2-OG) para formar glutamina e glutamato (Merrick e Edwards, 1995). Esses aminoácidos, por sua vez, servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. A principal via de assimilação de amônio em bactérias é a via da Glutamina Sintetase (GS). Nessa via, o glutamato é aminado à glutamina, a qual tem seu grupo amida transferido para o 2-OG pela enzima Glutamato Sintase (GOGAT) para formar duas moléculas de glutamato (Bulen and LeComte, 1966; Hageman and Burris, 1978).

1.3 Glutamina sintetase

A GS bacteriana, codificada pelo gene *glnA*, é uma proteína dodecamérica formada pela união face a face de dois anéis hexaméricos (Almassy et al, 1986). Desta forma, GS possui doze sítios ativos, com estrutura descrita como “funil duplo”, no qual o ATP e glutamato se ligam em extremidades opostas (Figura 1). Os anéis hexaméricos da GS se mantêm unidos graças às interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre eles (Almassy et al, 1986).

A atividade de GS pode ser regulada de múltiplas formas. Metabolicamente, o fluxo através de GS pode ser regulado até quatro vezes. Essa regulação metabólica ocorre via níveis de substrato (amônio e glutamato intracelular), inibição pelo produto (glutamina), o estado redox da célula (NADPH), e o estado energético da célula (ATP) (van Heeswijk, 2013). Além da regulação metabólica, a atividade de GS pode ser regulada por adenililação reversível de um resíduo conservado de tirosina em cada subunidade (Reitzer, 2003).



Figura 1. Modelo dodecamérico da estrutura tridimensional da Glutamina Sintetase de *H. seropedicae*.

1.4 GlnE

GlnE é uma enzima com 946 aminoácidos e 3 domínios funcionalmente e estruturalmente distintos. As duas atividades de GlnE (AT – Adenilil Transferase / AR - Adenilil Removedora) estão localizadas em dois domínios diferentes, mas homólogos (domínios Nucleotidil Transferase – NT) separados por um domínio ligante central (Figura 2).

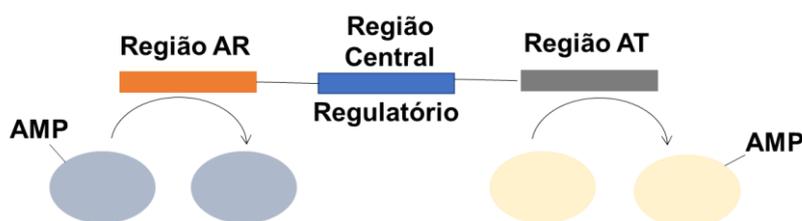


Figura 2. Domínios da proteína GlnE com atividade Removedora e atividade Transferase. O domínio N-terminal (Região AR) tem atividade removedora da modificação e o domínio C-terminal (Região AT) tem atividade de inserir a modificação e são separados por um domínio ligante central, o domínio regulador.

O domínio N-terminal tem atividade AR e o domínio C-terminal tem atividade AT (Jaggi et al, 1997; Clancy et al, 2007; Jiang & Ninfa, 2007). O domínio central interage com as proteínas da família PII e dependente desta interação para uma ou outra atividade (Clancy et al., 2007; Jaggi et al., 1997).

1.5 Proteínas da família PII

As proteínas PII são participantes importantes do sistema Ntr, controlando a atividade de muitas proteínas alvo através de interação proteína-proteína (Reitzer, 2003). Proteínas da família PII são homotrímeros usualmente submetidas à uridililação pós traducional) (Francis e Engleman, 1978).

As proteínas da família PII possuem alto grau de homologia entre si e são capazes de fazer a transdução de sinal através de interação proteína-proteína com diversos alvos. Elas podem regular enzimas, fatores de transcrição, proteínas de membrana, alvos principalmente relacionados ao metabolismo de nitrogênio (Huergo et al., 2013).

O efeito que as proteínas PII causam nos seus alvos depende tanto das mudanças conformacionais transmitidas pelos seus efetores moleculares, quanto as modificações pós traducionais que os homotrimêros podem acumular em seus T-loop (M. Merrick, 2015). *H. seropedicae* possui duas proteínas da família PII, uma codificada pelo gene *glnB* que é monocistrônico e expresso constitutivamente, e outra codificada pelo gene *glnK* que se encontra no operon *nlnAglmKamtB* que é NtrC-dependente (Noindorf et al., 2011).

1.6 Sistema Ntr

O sistema Ntr (“Nitrogen regulation system”) é formado por diversas proteínas, dentre elas: enzima glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*), NtrB, NtrC, UTase/UR (GlnD), ATase (GlnE) e proteínas do tipo PII (Merrick & Edwards, 1995). No sistema Ntr, a proteína efetora da transcrição é o regulador de resposta NtrC, que ativa a transcrição de promotores reconhecidos pela RNA-polimerase contendo σ 54 (Kustu et al., 1989).

A cinase sensorial do sistema Ntr, denominada NtrB, é bifuncional sendo cinase fosfatase. NtrB/NtrC formam um sistema de dois componentes clássico, onde NtrB é capaz de sensoriar sinais ambientais e transferir a informação para a proteína efetora NtrC através de uma fosforilação (Kamberov et al., 1994; Sanders et al., 1992).

Sob condições de limitação de nitrogênio, o grupamento UMP é adicionado à PII, promovendo a atividade de cinase da NtrB, resultando na fosforilação de NtrC. Por outro lado, a remoção de UMP da proteína PII promove a atividade de fosfatase da NtrB, interferindo nos níveis de expressão das proteínas de todo o sistema (Persuhn et al., 2000; Truan et al., 2010).

1.7 Mutação no gene *glnA*

Machado et al. (1991) selecionou, em um trabalho, mutantes espontâneos de *A. brasiliense* Sp7 capazes de excretar amônio que fixavam nitrogênio constitutivamente mesmo em concentrações altas de amônio, condição que não era encontrada na estirpe selvagem. Esse fenótipo encontrado nas estirpes mutantes foi atribuído a mutações pontuais no gene *glnA*, que codifica a enzima GS. A partir da realização um alinhamento estrutural de proteínas, as mutações encontradas no gene *glnA* das estirpes excretoras de *A. brasiliense* foram identificadas em *H. seropedicae*.

Devido ao fenótipo excretor encontrado em mutantes espontâneos nesses *Azospirillum brasilense* (Machado et al, 1991), o presente trabalho teve como objetivo substituir, por recombinação homóloga, o gene que codifica a proteína GS de *H. seropedicae* pelos genes contendo a mutação pontual encontrada no alinhamento estrutural de sequências, a G130S (O aminoácido Glicina sendo substituída pelo aminoácido serina na posição 130 da enzima), assim, gerando uma estirpe que expresse uma variante mutante de GS a partir do DNA cromossomal para estudos *in vivo*. Como o mecanismo de regulação da atividade da enzima GS de *H. seropedicae* e ainda carece de esclarecimento, esse trabalho também pretende fornecer dados que contribuam para o melhor entendimento da via de assimilação de nitrogênio dessa bactéria e sugerir formas de manipular geneticamente a bactéria com o objetivo de gerar estirpes capazes de fixação de nitrogênio de forma constitutiva.

2. Materiais e Métodos

2.1 Meios de cultura e condições de cultivo

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato (Klassen et al., 1997). Para os experimentos de conjugação foi utilizada uma combinação do meio NFb-malato e Luria-Bertani Ágar. Como fonte de nitrogênio foi adicionado 20 mM de cloreto de amônio ou 5 mM de glutamato, conforme indicado em cada experimento.

Para o preparo do meio NFb-malato, foi adicionada solução contendo fosfatos, composta por Fosfato Monopotássico (159,4 g/L) e Fosfato Dipotássico (17,8 g/L), sendo chamado de Nfb -malato HPN. Estas soluções foram esterilizadas por autoclavação separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso.

Para o preparo das placas de seleção dos transconjugantes foi utilizado o meio NFb-malato Ágar (Ágar 15 g/L) e para a estocagem das estirpes de *H. seropedicae* foi utilizado o meio NFb-malato semi-sólido (Ágar 1,5 g/L).

Todos os meios utilizados continham os antibióticos adequados para determinada seleção em cada etapa do experimento.

2.2 Bactérias e plasmídeos

As bactérias utilizadas neste trabalho foram *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) (estirpe para propagação e estoque de plasmídeos), *E. coli* S.17 (Simon et al., 1983) (estirpe conjugadora).

Utilizamos também a estirpe parental *H. seropedicae* SmRI (Souza et al., 2000). Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram o pETNde-M11 (Little et al, 2011) e o pK18-mobSacB (Schäfer et al., 1994).

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação dos genes de estudo em um volume final de 25 µL foi feita a seguinte reação: 2,5 µL do tampão da phusion DNA polimesase 10X, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,75 µL de cloreto de magnésio 50 mM, 0,5 µL de phusion DNA polimerase (produção própria), 2 µL de solução contendo DNA genômico de *H. seropedicae*, 16,75 µL de água ultrapura e 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1) 10 pM. A reação foi realizada em 25 ciclos de desnaturação (98°C, por 30 segundos), anelamento em gradiente de temperatura (45 segundos) e extensão (72°C, por 1 minuto). Após o final dos ciclos, 7 minutos de extensão a 72°C.

Nome	Sequência 5'- 3'
G130S_fwd	CACCGCCTACTTCAGTCCGGA
G130S_rev	TCCGGACTGAAGTAGGCGGTG
BamHI mut_fwd	GCCGACATGTCCGGATCCTTCG
BamHI mut_rev	CGAAGGATCCGGACATGTCCGGC
GS Rec_fwd	CATCTATCTAGAATGGCAAGGACGGCCGCAGA
GS Rec_rev	CGCACTGCAGTTACAGCGAGTAGTACATGTCTCGA

Tabela 1 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que foram utilizados nas reações da PCR deste trabalho

2.4 Amplificação de 5 variantes do gene que codifica para GS

Uma mutação que codificam enzimas GS contendo a substituição G130S foi adicionada no gene *glnA* de *H. seropedicae*. Dessa forma, na posição 130 da enzima, o aminoácido Glicina foi substituído por Serina (G130S).

Para compor a estratégia utilizada para reconhecimento do evento de recombinação, foi adicionada ainda uma mutação silenciosa que insere um novo sítio *BamHI* na posição 447 pb do gene *glnA*, gerando o fragmento *glnABamHIMut*.

Para construir esses genes contendo a mutação pontual, o gene *glnA* foi submetido a duas amplificações por PCR com dois pares de iniciadores para cada mutação: um par abrangendo a região inicial do gene até o ponto da mutação (fragmento *up*) e o outro par

abrangendo a região partir da mutação até o final do gene (fragmento *down*). Os primers internos das ampliações *up* e *down* eram complementares entre si e possuíam a mutação pontual desejada. Os fragmentos *up* e *down* eram então unidos em uma nova reação de PCR, utilizando os primers flanqueadores do gene, a PCR *overlapping*. O esquema de construção dos mutantes está mostrado na Figura 3. Para a clonagem em vetor de recombinação, os primers flanqueadores usados foram o GS rec_fwd e GS rec_rev. O produto dessa segunda reação de PCR correspondia ao gene *glnA* contendo a mutação desejada.

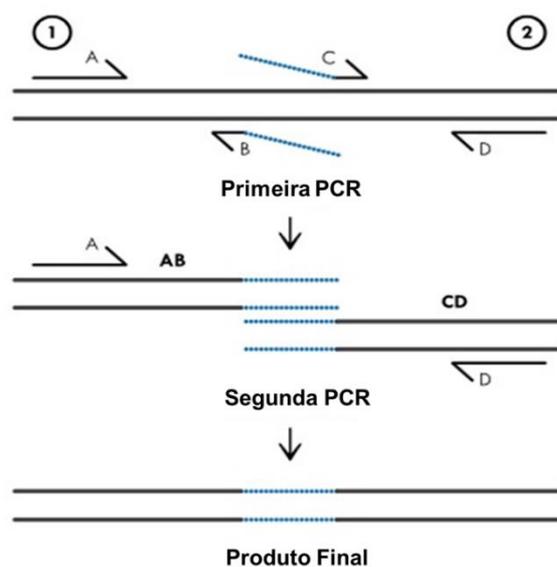


Figura 3. Estratégia utilizada nas reações de PCR para a síntese das variantes mutantes do gene *glnA*.

Os primers internos são complementares e possuem a mutação pontual desejada. As regiões inicial e final do gene foram amplificadas separadamente. A seguir, uma nova PCR foi realizada, utilizando os produtos da primeira PCR como molde, com os primers externos. O produto final corresponde ao gene *glnA* contendo a mutação desejada.

Para a clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de expressão pK18MobSacB., o fragmento correspondente ao gene *glnA* contendo a mutação foram clonados nos sítios *PstI* e *XbaI* do vetor.

2.5 Construção das estirpes mutantes de *H. seropedicae*

As culturas de *E. coli* S17 com o plasmídeo recombinante (célula doadora) e *H. seropedicae* (célula receptora) foram cultivadas sob agitação em meio de cultura e sem adição de antibióticos.

Após o período de crescimento, as estirpes doadora e receptora foram misturadas em proporções diferentes em microtubos e plaqueadas em polos opostos da placa em meio Malato e LA. A seguir, a massa de células formada foi raspada, ressuspensa em meio NFb-Malato, diluídas seriadamente e uma alíquota de 250 µl plaqueada em meio NFb-malato sólido sem adição de fosfatos e com antibióticos para a seleção.

Após 48 horas, as colônias crescidas na placa, foram inoculadas em meio NFb-malato contendo antibióticos para seleção, reinoculadas e então, foi realizada uma reação de PCR com os supostos recombinantes simples para confirmação da inserção da mutação no primeiro evento de recombinação.

Os supostos recombinantes foram escolhidos e cultivados durante a noite. Após o crescimento, 250 µl das culturas retirados e plaquados em NFb-Malato sólido contendo o antibiótico estreptomicina 80 µg/mL e 5% de sacarose para seleção positiva, incubados por 48 horas a 30°C. As colônias crescidas na placa foram riscadas e selecionadas novamente em placas contendo antibióticos de seleção por 48h incubadas a 30°C e então, as colônias crescidas foram cultivadas, e submetidas a uma outra reação de PCR para confirmação do segundo evento de recombinação.

O produto desta reação de PCR foi cortado com a enzima de restrição *BamHI* para confirmação da presença da mutação silenciosa no gene, o que comprovaria o segundo evento de recombinação.

2.6 Reação Biossintética

As reações biossintéticas de GS foram realizadas em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 5 µg de proteína GS para proteínas purificadas ou 5 µg de proteína total para os extratos das estirpes de *H. seropedicae* e o mix biossintético, que contém Imidazol pH 7,5 (100 mM), hidroxilamina (50 mM), MgCl₂ (60 mM), glutamato (170 mM). As reações foram disparadas pela adição de ATP (concentração final de 14 mM) e incubada a 37°C por 60 minutos.

A reação foi parada com a adição de um Stop Mix, composto de Cloreto férrico (0,04 mM), Ácido tricloroacético (0,12 mM) e Ácido Clorídrico (0,61 mM). A quantificação da reação foi feita através da leitura da absorbância a 490 nm do produto.

As reações com mix biossintético também foram realizadas com os íons Mn²⁺, adicionando-se MnCl₂ (60 mM) ao invés de MgCl₂.

3. Resultados

3.1 Amplificação das variantes do gene que codifica para GS e Clonagem dos genes que serão usados para Recombinação Homóloga

Para a construção de estirpes de *H. seropedicae* contendo o gene mutantes desse trabalho, era necessário inicialmente desenvolver uma forma para diferenciar facilmente a versão selvagem das versões mutantes do gene *glnA*. Para isso, nós inserimos uma mutação silenciosa no gene *glnA* que conferia um novo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Bam*HI, e essa versão gênica, chamada *glnABam*Mut, foi utilizada para a inserção das mutações do estudo. Os genes mutantes foram construídos utilizando a metodologia de *primers* complementares.

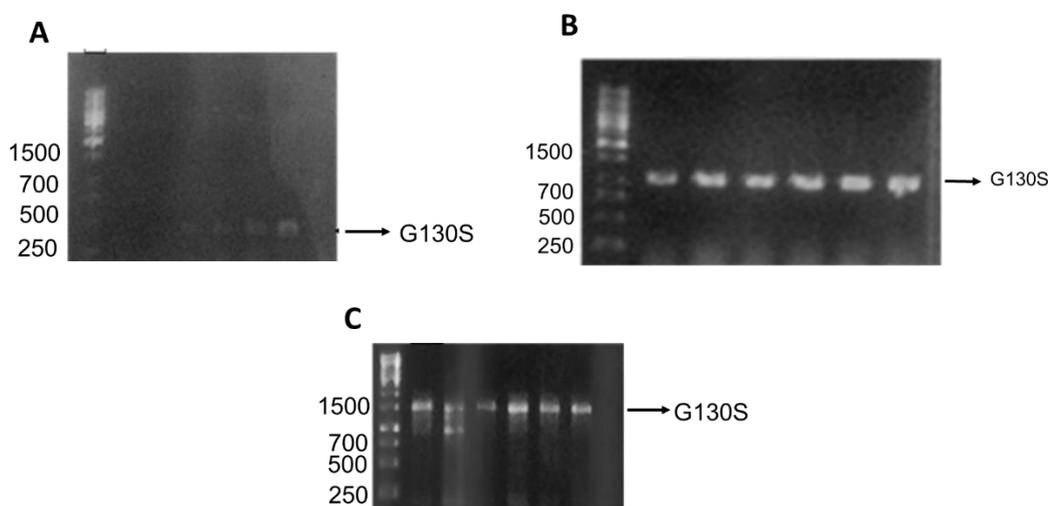


Fig.4 - Amplificação dos fragmentos do gene para inserção da mutação G130S no gene *glnA* de *Herbaspirillum seropedicae*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV. O primeiro poço de cada gel contém o marcador 1kb fermentas – GeneRuler. **A)** Fragmento Down (395 pb) **B)** Fragmento UP (1042 pb); **C)** PCR *overlapping* (1416 pb)

Após a construção, a variante gênica G130S foi clonada no vetor pK18Mob-sac. A confirmação da clonagem do plasmídeo G130S-pK18 foi feita através da digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição e reação de PCR (Figura 5).

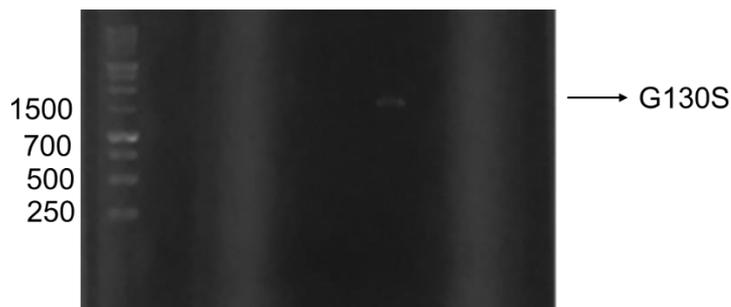


Figura 5. Confirmação da clonagem do gene que codifica a variante GS - G130S no vetor pK18Mob-sac. Confirmação de Clonagem da variante mutante G130S através de PCR. Ampliação do gene *glnA* utilizando os primers *GS Rec up* e *GS Rec down*. As amostras foram corridas em gel de agarose 1%, tratado com brometo de etídeo, a 70V, marcador 1kb ladder – Fermentas GeneRuler.

3.2 Eventos de Recombinação Homóloga

Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo G130S-pK18 foi utilizado para eventos de recombinação homóloga com o genoma da bactéria *H. seropedicae*, para obtenção de transconjugante mutante que expresse essa variante da GS.

A recombinação acontece em dois eventos de recombinação homóloga simples. No primeiro evento, o plasmídeo inteiro é integrado ao genoma, e não há a perda da cópia selvagem. Assim, esse primeiro mutante possui duas cópias do gene *glnA*, a mutante e a selvagem, e pode ser selecionado pela resistência ao antibiótico Canamicina, a qual é conferida pelo plasmídeo inserido. No segundo evento, ocorre uma recombinação intramolecular: as duas cópias recombinam entre elas, com a expulsão do plasmídeo juntamente com uma das cópias do gene *glnA*. Teoricamente, há iguais chances de ser expulsa a versão mutante ou a versão selvagem. Esse segundo recombinante é selecionado por uma seleção negativa. Isso é possível pois o plasmídeo possui o gene *sacB*, que confere toxicidade quando a sacarose está presente. Logo, o recombinante que expulsou o plasmídeo com uma das cópias do gene *glnA* é um duplo recombinante que não cresce em Canamicina e cresce em sacarose, e essas características permitem o seu isolamento. Após o primeiro evento de recombinação, a ocorrência evento genético foi confirmada através da realização de PCR e digestão com a endonuclease de restrição *Bam*HI para a detecção de duas cópias do gene alvo, ou seja, uma cópia selvagem e outra cópia com a mutação de interesse. A partir disso, os recombinantes simples foram identificados, crescidos em meio Nfb malato-HPN, e plaqueados em meio contendo sacarose para seleção, como mostrado na Figura 6.

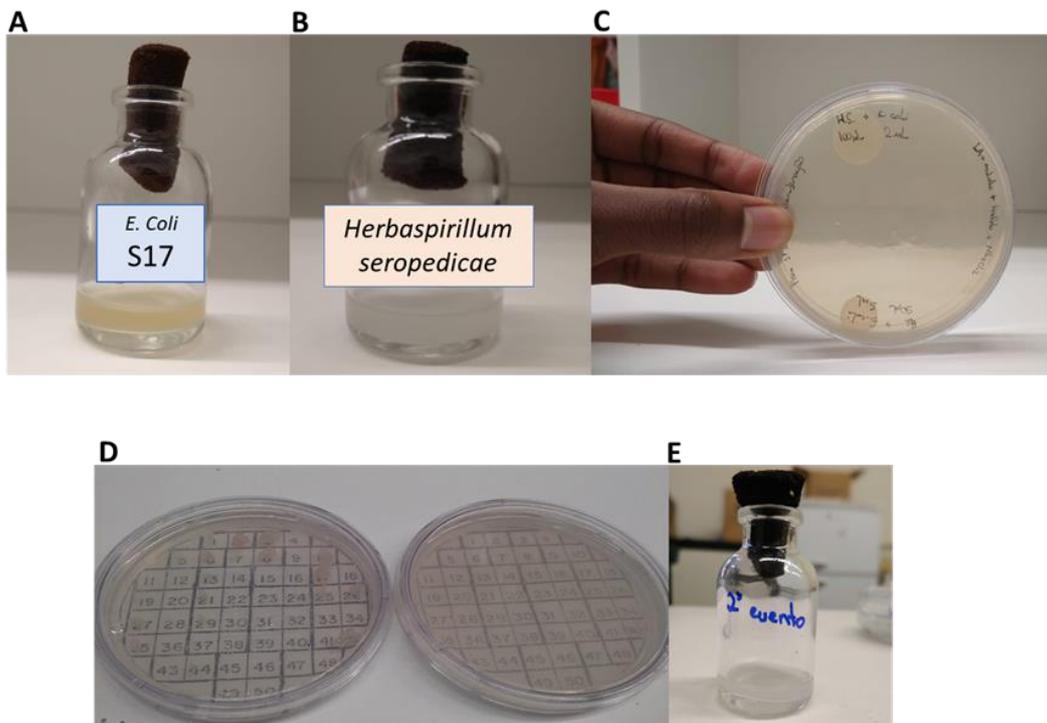


Figura 6. Eventos de Recombinação Homóloga. A Culturas de *E. coli* S17 contendo o plasmídeo recombinante. B- Cultura de *H. seropedicae*. C- Placa do primeiro evento de recombinação contendo a célula doadora e a receptora, plaqueadas em forma de gota nos polos da placa. D- Placa NFb-Malato ágar para seleção dos recombinantes simples quanto a sensibilidade. E. Transconjugante do segundo evento de recombinação contendo o gene mutante.

Após os eventos de recombinação homóloga, os supostos transconjugantes foram submetidos novamente a PCR para amplificar a região do gene *glnA* que possui a mutação silenciosa para reconhecimento do sítio *Bam*HI. Foram utilizados os primers G54C_Fwd e H250R_rev que abrangem a região *glnABamMut* do gene (Figura 7).

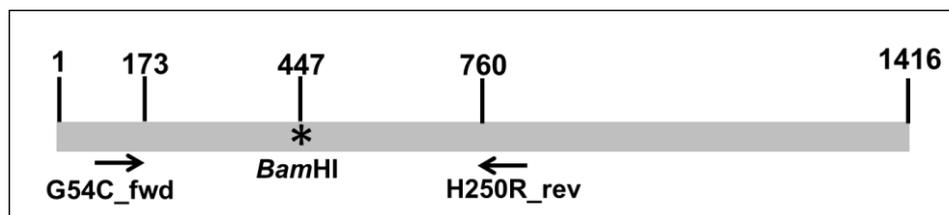


Figura 7. Estratégia utilizada nas reações de PCR para confirmação dos eventos de recombinação homóloga. Foram utilizados os primers G54C_fwd e H250R_rev que abrangem a região *glnABamMut* do gene, que possui a mutação silenciosa, gerando um fragmento de aproximadamente 600pb.

A amplificação da PCR gerou como produto, um fragmento de aproximadamente 600pb (Figura 8).



Figura 8. PCR da região *glnABamMut* dos prováveis mutantes. Perfil eletroforético, em gel de agarose 1,2% em TBE 1X. (C) controle, produto de PCR do plasmídeo recombinante, **SmRI**, produto de PCR da estirpe selvagem, e os supostos mutantes do segundo evento respectivamente.

Os produtos de PCR foram digeridos com a endonuclease de restrição *Bam*HI, para a confirmação da inserção da cópia mutante do gene e expulsão da cópia selvagem do genoma do transconjugante. Esta verificação foi feita através da análise da digestão do fragmento de 600pb, com a enzima supracitada gerando dois fragmentos de aproximadamente 300 pb cada um (Figura 9).

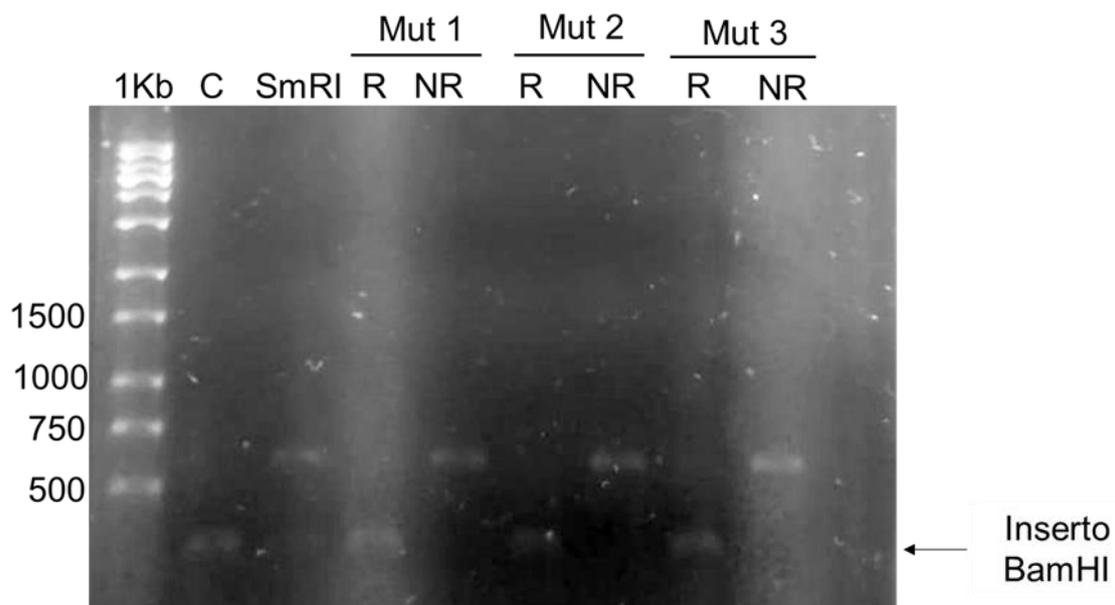


Figura 9. Confirmação das estirpes de *H. seropedicae* mutantes do segundo evento de recombinação. Perfil eletroforético, em gel de agarose 1,2% em TBE 1X dos produtos

de PCR digeridos com a enzima *Bam*HI. Poços: marcador de pares de base, **C** controle, que corresponde ao do plasmídeo recombinante digerido com *Bam*HI, **SmRI** estirpe selvagem com banda GS 600 pb digerida com *Bam*HI, **Mut1**, **Mut2** e **Mut3** os mutantes de interesse do segundo evento de recombinação, onde **R** corresponde a região *glnABamMut* do gene amplificada e digerida com endonuclease de restrição *Bam*HI, liberando o fragmento em 313 pb e **NR** corresponde a região *glnABamMut* amplificada sem a digestão com a endonuclease de restrição, respectivamente.

Os resultados mostrados na Figura 6 confirmam que a estirpe contendo a mutação G130S foi construída com sucesso, a qual foi chamada de AP05.

3.3 Atividade Biossintética

A atividade biossintética *in vivo* de GS da estirpe mutante AP05 foi avaliada em duas fontes de nitrogênio diferentes: 5 mM de glutamato e 20 mM de amônio. A condição de crescimento em glutamato simula uma baixa disponibilidade de nitrogênio, enquanto que amônio simula alta disponibilidade de nitrogênio.

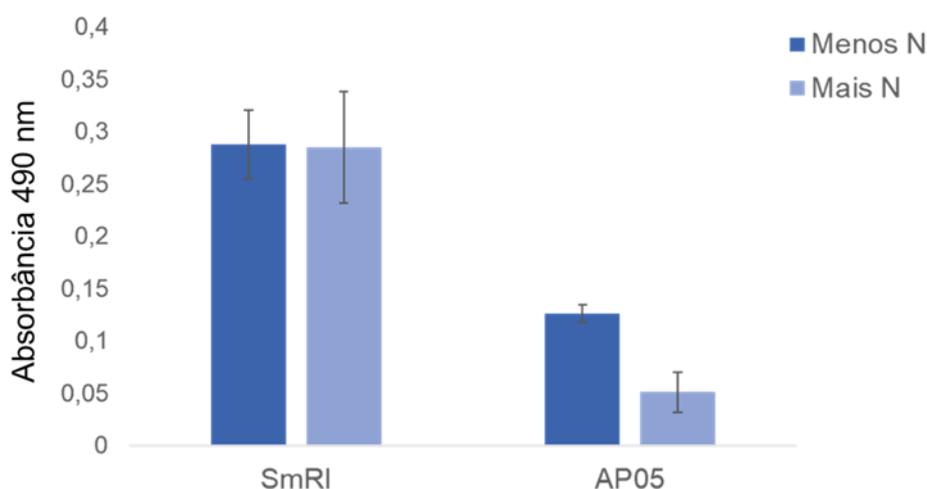


Figura 10. Atividade Biossintética. Em cada reação foi adicionado 5 µg do extrato *in vivo* das culturas selvagem e mutante, as reações foram incubadas por 60 minutos a 37°C na presença de MgCl₂. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes realizados com 3 culturas saturadas diferentes, as barras de erro mostram o desvio padrão encontrado para cada média.

Os resultados da Figura 10 mostram que a estirpe mutante possui atividade biossintética menor do que a estirpe selvagem em meios que simulam o ambiente com baixa e alta disponibilidade de nitrogênio. No entanto, diferente do selvagem, aparentemente a linhagem mutante tem uma regulação da atividade de GS de acordo com a disponibilidade de nitrogênio.

4. Discussão

A estirpe mutante AP05 foi construída com sucesso. A realização da reação PCR e a digestão com enzima de restrição confirmaram que houve a expulsão da cópia selvagem do gene. Em uma caracterização inicial, a Figura 10 mostra que a GS expressa pela variante possui menor atividade biossintética em relação a estirpe selvagem SmRI, o que pode indicar que está ocorrendo uma alteração no metabolismo de assimilação de nitrogênio da bactéria.

Estudos posteriores são necessários para maiores caracterizações da atividade nitrogenase da estirpe mutante.

5. Agradecimentos

"O presente trabalho foi realizado com apoio do cnpq, conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico - Brasil".

Os autores agradecem às agências de fomento CAPES e CNPq, ao COMCAP, à Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Bioquímica e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Referências

- ALMASSY, R.J.; JANSON, C.A.; HAMLIN, R.; XUONG, N.H.; EISENBERG, D. Novel Subunit-Subunit Interactions in the Structure of Glutamine Synthetase. **Nature**, v. 323, p. 304-309, 1986.
- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in Soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p. 1-9, 2003.
- BULEN, W.A.; LECOMTE, J.R. The Nitrogenase System of *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution and ATP-hidrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 56, p. 979-986, 1966.
- CLANCY, P.; XU, Y.; VAN HEESWIJK, W.C.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain. **FEBS J**, v. 274, p. 2865-2877, 2007.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.
- GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: **Mechanisms and Applications. Scientifica**, v.2012, p. 1-15, 2012.
- HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 75, p. 2699-2702, 1978.

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

JAGGI, R.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; OLLIS, D.L.; VASUDEVAN S.G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**, v. 16, p. 5562–5571, 1997.

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

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Effect of mutations in *Escherichia coli glnL* (ntrB), encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. **Journal of Biological Chemistry**, 269(45), 28294–28299, 1994.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 887–891, 1997.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J., POPHAM, D.; & WEISS, D. Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiological Reviews**, 53(3), 367, 1989.

LITTLE, R.; SALINAS, P.; SLAVNY, P.; CLARKE, T. A; DIXON, R..Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission, **Mol. Microbiol.**, 82 222–235, 2011.

MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, 5, 763, 2015.

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

NOINDORF, L.; BONATTO, A. C.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; & CHUBATSU, L. S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiology**, 11(1), 1–8, 2011.

PERSHUN, D.C.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 192, p. 217–221, 2000.

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

SCHÄFER, A.; TAUCH, A.; JÄGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, 145(1), 69–73, 1994.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O., RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, 146(6), 1407-1418, 2000.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; LI, X.-D.; WINKLER, F. K. A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **Journal of Molecular Biology**, 400(3), 531–539, 2010.

van HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; BOOGERD, F.C. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, p. 628-695, 2013.