

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

BÁRBARA BARIZÃO NOGUEIRA

Caracterização funcional da enzima Glutamina Sintetase de *Azospirillum
brasilense*

Maringá
2022

BÁRBARA BARIZÃO NOGUEIRA

Caracterização funcional da enzima Glutamina Sintetase de *Azospirillum
brasilense*

Dissertação 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 em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Schüler de Oliveira

Maringá
2022

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

N778c

Nogueira , Bárbara Barizão

Caracterização funcional da enzima Glutamina sintetase de *Azospirillum brasilense* /
Bárbara Barizão Nogueira . -- Maringá, PR, 2022.
43 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Schüler de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências
Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Metabolismo de nitrogênio. 2. Sistema ntr. 3. *Azospirillum brasilense*. I. Schüler de
Oliveira, Marco Aurelio , orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 572.43

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065

FOLHA DE APROVAÇÃO

BÁRBARA BARIZÃO NOGUEIRA

Caracterização funcional da enzima Glutamina Sintetase de *Azospirillum
brasiliense*

Dissertação 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 em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 10 de maio de 2022

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Marco Aurelio Schüler de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Gislaine Cristiane Mantovanelli
Universidade Estadual do Norte do Paraná

Profa. Dra. Josielle Abrahão
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Bárbara Barizão Nogueira, nascida em 28 de setembro de 1998, na cidade de Maringá-PR, sempre foi uma pessoa muito curiosa, simples respostas não eram suficientes para sanar suas dúvidas e interesses. No ensino médio, quando foi o momento de buscar uma profissão, optou por um curso que pudesse responder muito de seus questionamentos. Tendo maior afinidade com as áreas de biológicas, em 2016, ingressou na graduação no curso de Bioquímica, na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Durante esse período de estudos, teve a oportunidade de realizar atividades de iniciação científica em bioquímica e biologia molecular, onde se apaixonou completamente pela área. Em 2020, iniciou o curso de mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular, onde sob a orientação do Prof. Dr. Marco Aurelio Schüller de Oliveira, desenvolveu o presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida e por estar sempre presente me ajudando alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, Rozinei e Eurico, por sempre me apoiarem e incentivarem a buscar meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão Murilo por todo apoio e compreensão.

Ao professor Marco Aurelio sou muito grata pela orientação, pela oportunidade de aprender todo dia um pouco mais com ele, por toda paciência e dedicação nesses anos.

Ao Eduardo, que dedicou seu tempo e paciência para compartilhar seus conhecimentos e me ensinar muito a cada dia. Sou grata por todas as nossas conversas e a amizade que construímos.

À Larissa e Josi, agradeço a amizade, conselhos, tanto de laboratório quanto de vida, e as muitas tardes de conversas.

Às demais colegas de laboratório, Amanda, Ana Paula, Lorena e Larissa Ricardini, pelo companheirismo e auxílios no dia-a-dia.

Agradeço os meus amigos que tenho carregado durante a vida, e também aqueles que chegaram recentemente, por sempre torcerem por mim, me apoiarem e incentivarem a ser a minha melhor versão.

Por fim, agradeço a CNPq pelo suporte financeiro durante a realização do trabalho.

APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido ao periódico Protein Expression and purification (ISSN: 1046-5928), com modificações para facilitar o entendimento do texto.

SUMÁRIO

BIOGRAFIA

AGRADECIMENTOS

APRESENTAÇÃO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO GERAL

RESUMO

ABSTRACT

1.Introdução.....	15
1.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	15
1.2. Vias de assimilação de amônio em bactérias.....	15
1.2.1. Enzima Glutamina sintetase (GS).....	16
1.2.2. Reações catalisadas por GS.....	17
1.3. Regulação pelo sistema Ntr.....	18
2. Materiais e Métodos.....	22
2.1. Bactérias e plasmídeos.....	22
2.2. Meios de cultura.....	22
2.3. Transformação bacteriana	22
2.4. Expressão de proteínas.....	23
2.4.1. Teste de expressão <i>glnA</i> -Tev2.....	23
2.4.2. Expressão de GS em alto e baixo nitrogênio.....	23
2.4.3. Expressão GlnE.....	23
2.5. Purificação de Proteínas.....	24
2.6. Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	24
2.7. Ensaio de atividade biossintética de GS.....	25
2.8. Ensaio de atividade γ -GT de GS.....	25
2.9. Desadenililação de GS <i>in vitro</i>	25
2.10. Uridililação de GlnB <i>in vitro</i>	26
3.Resultados e discussão	27
3.1. Expressão e purificação de GS de <i>A. brasilense</i>	27
3.1.1. Teste de expressão.....	27
3.1.2. Purificação de GS de <i>A. brasilense</i>	29
3.2. Caracterização da atividade da GS.....	30
3.2.1. Curva de concentração de GS.....	30
3.2.2. Curva de concentração de substratos	32
3.2.3. Curvas de pH.....	35

3.3. Caracterização da atividade adenilil removedora (AR) da GlnE de <i>A. brasilense</i>	38
3.3.1. Efeito de GlnB e GlnB-UMP ₃ sobre a desadenililação de GS por GlnE.....	39
4. Considerações finais	42
5. Referências	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de assimilação de amônio em bactérias.....	16
Figura 2 – Estrutura da Glutamina sintetase de <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 3 – Modelo estrutural da proteína GlnB de <i>E. coli</i>	19
Figura 4 – Teste de expressão da proteína GS de <i>A. brasilense</i>	27
Figura 5 – Determinação da condição para expressão das diferentes formas de GS.....	28
Figura 6 – Purificação das enzimas GS-AMP e GS de <i>A. brasilense</i>	29
Figura 7 – Curva de concentração de GS na atividade biossintética.....	31
Figura 8 – Curva de concentração de GS na atividade γ -GT.....	32
Figura 9 – Curva de concentração de substratos.....	33
Figura 10 - Curva de concentração de substratos.....	34
Figura 11 – Ajuste dos dados de atividade da enzima GS-AMP à cinética de Michaelis-Menten.....	35
Figura 12 – Curva de pH da atividade Biossintética das preparações de GS.....	36
Figura 13 – Curva de pH da atividade γ -GT das preparações de GS.....	37
Figura 14 – Curva de pH da atividade γ -GT das preparações de GS.....	38
Figura 15 – Reação de desadenililação de GS por GlnE.....	39
Figura 16 - Reação de desadenililação de GS por GlnE na presença de GlnB e GlnB-U ₃ MP ₃ de <i>H. seropedicae</i>	40
Figura 17 – Reação de desadenililação de GS por GlnE na presença de diferentes concentrações de efetores.....	41

RESUMO GERAL

O nitrogênio é um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em diversos ambientes. Por isso, a agricultura moderna faz uso de grandes quantidades de fertilizante nitrogenado para manter a produtividade em altos níveis. No entanto, além desses fertilizantes serem caros, a sua fabricação e utilização causam sérios danos ambientais. Uma forma de diminuir a utilização desses fertilizantes, reduzindo os custos de produção e mitigando os danos ambientais, é o emprego da inoculação das culturas vegetais com bactérias fixadoras de nitrogênio. Essas bactérias podem se associar com as plantas de diversas formas, reduzir o nitrogênio atmosférico e transferir moléculas nitrogenadas para a planta hospedeira. Esse tipo de tecnologia já é bastante utilizado para leguminosas, como soja, por exemplo. No entanto, o mercado ainda carece de inoculantes eficientes para plantas gramíneas. Por isso, bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de se associar com as principais culturas de gramíneas tem despertado interesse. Um dos obstáculos para a utilização dessas bactérias como biofertilizantes comerciais é o efeito ainda limitado de promoção de crescimento vegetal por essas bactérias. Uma forma de superar esse obstáculo é manipular geneticamente essas bactérias para produzir linhagens com maior capacidade de fixação de nitrogênio do que as linhagens selvagens. Um exemplo de vias metabólicas que podem ser manipuladas para gerar essas linhagens superiores são aquelas envolvidas com a assimilação de amônio.

Dentre as bactérias promotoras de crescimento de gramíneas, pode ser citada a espécie *Azospirillum brasilense*, capaz de se associar epifiticamente e endofiticamente com diversas plantas de interesse econômico, como cana de açúcar, arroz, trigo e milho. Embora o metabolismo de fixação de nitrogênio dessa bactéria já tenha sido detalhadamente descrito, pouco ainda se sabe sobre o metabolismo de assimilação de amônio de *A. brasilense*. A manipulação dessas vias para gerar estirpes superiores depende necessariamente do profundo conhecimento dos detalhes estruturais e funcionais das enzimas envolvidas.

A principal via de assimilação de nitrogênio em bactérias se inicia com a condensação do amônio em uma molécula de glutamato para formar a glutamina, em uma reação catalisada pela enzima Glutamina Sintetase (GS). A atividade da enzima GS é regulada por um intrincado mecanismo que envolve regulação alostérica e modificação pós-traducional. Essa modificação covalente de GS se trata de uma adenililação reversível, catalisada pela enzima bifuncional GlnE – GlnE catalisa a adição e também a

remoção de grupamentos adenilil de GS. Nos organismos na qual a GS já foi estudada, a adenililação provoca uma diminuição na atividade catalítica da enzima.

No presente trabalho nós estudamos *in vitro* o efeito da adenililação da GS de *A. brasilense*. Para isso, nós determinamos condições para superexpressar a enzima em sistema heterólogo nos dois estados de modificação pós-traducional: adenililada ou não modificada. Uma vez definidas essas condições, as duas formas de GS foram purificadas por cromatografia de afinidade, e sua atividade *in vitro* determinada. As melhores condições para verificação da atividade de GS foram prospectadas.

Neste trabalho ainda foi purificada a enzima GlnE de *A. brasilense*, responsável por alterar o estado de modificação covalente de GS. A atividade adenilil removedora dessa enzima foi testada, e os resultados indicaram um novo mecanismo de regulação ainda não descrito em outras bactérias.

Os resultados aqui apresentados acumulam conhecimento sobre os mecanismos regulatórios envolvidos na modulação do metabolismo de assimilação de amônio de *A. brasilense*, e serão essenciais para o desenvolvimento de novas linhagens superiores na capacidade de promover o crescimento vegetal.

Resumo

A principal via de assimilação de amônio em bactérias é conhecida como GS-GOGAT. Nessa via, o amônio é utilizado para aminar o glutamato formando glutamina, a qual serve como doadora de grupo amino para diversas reações biossintéticas. A enzima Glutamina Sintetase (GS) sofre uma regulação complexa, que envolve regulação alostérica e uma adenililação pós-traducional reversível. Tanto a adição de grupamentos AMP à GS quanto a sua remoção são catalisadas pela enzima GlnE. O presente trabalho teve como objetivo purificar a enzima GS de *A. brasilense* nos estados adenililada e não modificada e testar suas atividades *in vitro*. As condições para se obter as duas formas da enzima foram determinados, e as propriedades funcionais de ambas foram determinadas. Nós ainda purificamos a GlnE de *A. brasilense* e descrevemos o mecanismo de regulação da atividade adenilil removedora (AR) desta enzima. Os resultados mostraram que a atividade AR da GlnE de *A. brasilense* é estimulada por ATP, ADP e 2-OG, sendo que ATP e 2-OG possuem um efeito sinérgico positivo nesta atividade.

Abstract

The main pathway of ammonium assimilation in bacteria is known as GS-GOGAT. In this pathway, ammonium is used to aminate glutamate to form glutamine, which serves as an amino group donor for many biosynthetic reactions. The enzyme Glutamine synthetase (GS) undergoes a complex regulation, which involves allosteric regulation and a reversible post-translational adenylation. Both addition of AMP groups to GS and their removal are catalyzed by the enzyme GlnE. The objective of the present work was to purify the GS enzyme from *A. brasilense* in adenylylated and unmodified states and test its activities *in vitro*. The conditions for obtaining the two forms of the enzyme, as well as their functional properties, were determined. We also purified GlnE from *A. brasilense* and described the mechanism of regulation of the adenylyl-removing (AR) activity of this enzyme. The results showed that the GlnE AR activity of *A. brasilense* is stimulated by ATP, ADP and 2-OG, with ATP and 2-OG having a positive synergistic effect on this activity.

1. Introdução

1.1 *Azospirillum brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são não-patogênicas e capazes de promover o crescimento de plantas [1,2]. O microrganismo *Azospirillum brasilense* é uma α -proteobactéria Gram-negativa capaz de efetuar todas as vias de fixação do nitrogênio, exceto a nitrificação [3]. *A. brasilense* apresenta durante seu desenvolvimento em meio líquido um único flagelo polar com função natatória, no entanto, durante seu crescimento em meio sólido há a indução de flagelos laterais adicionais, que permitem o povoamento bacteriano nas superfícies sólidas [4].

São bactérias quimiorganotróficas típicas, capazes de realizar a absorção de hidrogênio pela atividade da hidrogenase, produzem fitohormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, realizam a fixação de N_2 em condições tropicais, e podem colonizar a superfície e os tecidos internos de milho, trigo, arroz, sorgo e ainda de plantas não gramíneas [5].

O potencial da capacidade da utilização de *A. brasilense* como um inoculante promotor de crescimento vegetal já é amplamente documentado. Como exemplo, o milho inoculado com *A. brasilense* apresentou o número e massa das espigas superior ($15,2 \text{ mil ha}^{-1}$ e $6,2 \text{ Mg ha}^{-1}$) quando comparado ao não inoculado com a bactéria ($9,5 \text{ mil ha}^{-1}$ e $3,6 \text{ Mg ha}^{-1}$) [6]. Como um segundo exemplo, a co-inoculação de *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* spp. em soja mostrou um aumento de 11% da massa das raízes, 5,4% de número de nódulos e 10,6% da massa dos nódulos em comparação com a soja apenas inoculada com *Bradyrhizobium* spp. Esses resultados foram seguidos de aumentos no rendimento de grãos, nas concentrações de nitrogênio em brotos e grãos na maturidade fisiológica, indicando que a inoculação contribui para o aumento do nitrogênio fixado [7].

1.2 Vias de assimilação de amônio em bactérias

Na maioria das células, os principais doadores de nitrogênio para as reações de biossíntese são a glutamina e o glutamato, sendo que o NH_4^+ é incorporado nesses aminoácidos através das vias glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) e da via da glutamato desidrogenase (GDH) [8].

Na via de assimilação pela enzima GDH, a aminação redutiva do 2-oxoglutarato (2-OG) gera o glutamato (Fig.1 A). Por outro lado, via GS-GOGAT, a enzima GS fica

responsável pela catalisação da amidação do glutamato para formar a glutamina e, em seguida, a transferência da amida para o 2-OG é catalisada pela GOGAT, formando duas moléculas de glutamato (Fig.1 B) [9]. Em *E. coli* o modelo mais aceito propõe que as duas vias ocorrem em condições metabólicas distintas: em ambiente com limitação de N, a via GS-GOGAT seria mais utilizada devido o K_m da GS ser menor para o amônio do que o K_m da enzima GDH [10]. Nesse modelo, a via da GDH, por sua vez, seria preferível durante condições de limitação energética, já que a reação de GS consome ATP [11].

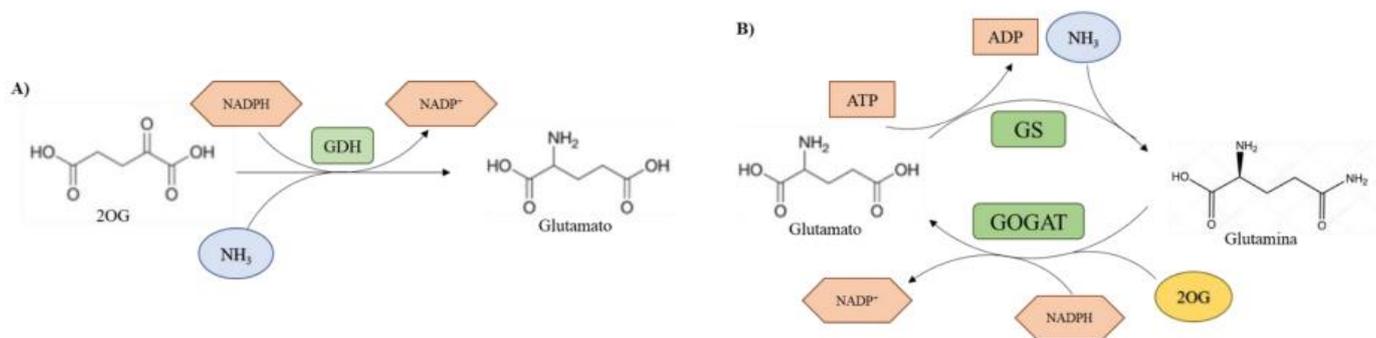


Figura 1. Vias de assimilação de amônio em bactérias. (A) Assimilação de amônio via glutamato desidrogenase (GDH). (B) Assimilação de amônio via glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) [12].

1.2.1 Enzima Glutamina Sintetase (GS)

A enzima Glutamina Sintetase (GS; EC 6.3.1.2.), codificada pelo gene *glnA*, possui uma forma dodecamérica formada por dois anéis hexaméricos com os 12 sítios ativos entre eles, ligados por interações hidrofóbicas e interações de hidrogênio [13,8]. Cada um dos sítios ativos da GS possui uma característica estrutural de um funil duplo (Fig. 2) tendo, na junta, dois sítios de ligação para íons, onde pode haver a ligação de magnésio ou manganês [14]. O ATP e o glutamato se ligam em extremidades opostas do funil, facilitando a sequência de eventos da catálise. No primeiro passo, ocorre a transferência de um grupo fosfato do ATP para o glutamato, gerando assim o intermediário ativado γ -glutamil-fosfato. No segundo passo, o amônio ataca o intermediário, liberando o grupamento fosfato e formando assim a glutamina [14].

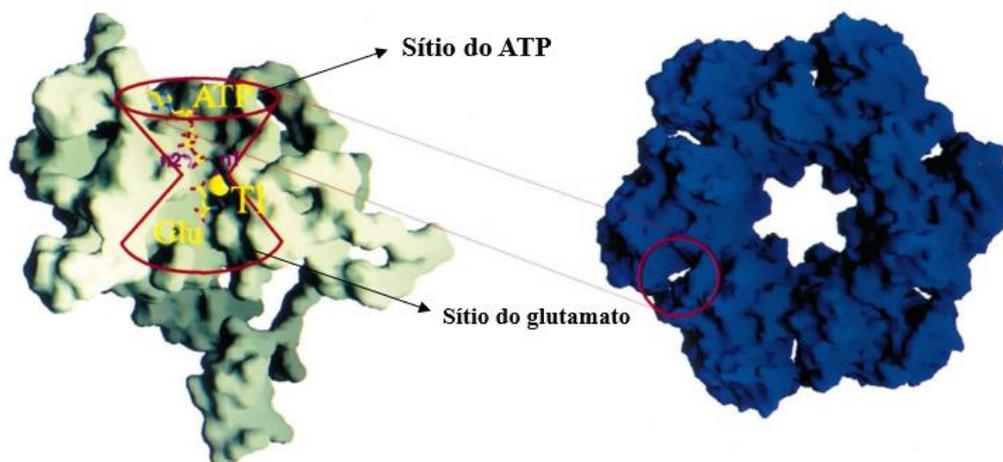


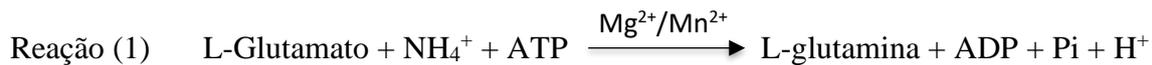
Figura 2. Estrutura da Glutamina Sintetase de *Escherichia coli*. Dodecâmero formado por dois anéis hexaméricos, com os 12 sítios ativos entre eles. Cada um dos sítios ativos, possuem uma característica estrutural de um funil duplo, no qual o ATP e o glutamato se ligam em extremidades opostas [16].

A GS é uma enzima chave no metabolismo de nitrogênio, sendo a via primária da entrada ou reentrada do amônio nesse metabolismo ramificado, no qual é responsável pela catálise da síntese de glutamina a partir do glutamato e NH_4^+ , sendo uma reação que depende de íons metálicos e ATP (Fig. 1) [15,16]. Devido à sua dependência de ATP, o gasto energético da reação catalisada por GS é muito alto, sendo assim, a sua atividade precisa ser regulada em função do estado energético e do nitrogênio intracelular [10].

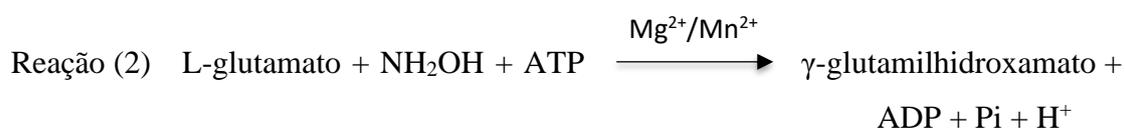
A regulação de GS acontece tanto pelo controle da concentração da enzima, via regulação da transcrição do gene *glnA*, quanto pelo controle cinético pela modulação alostérica e modificação pós-traducional através de adenililação reversível catalisada por GlnE, que será descrito a seguir. As regulações traducional e pós-transcricional são relacionadas através do sistema Ntr. Em *E. coli*, a reação catalisada por GS é inibida por alguns dos produtos finais do metabolismo da glutamina, sendo eles, serina, alanina, glicina, triptofano, histidina, carbamoil fosfato, glucosamina-6-fosfato, AMP e CTP [17, 14].

1.2.2 Reações catalisadas pela GS

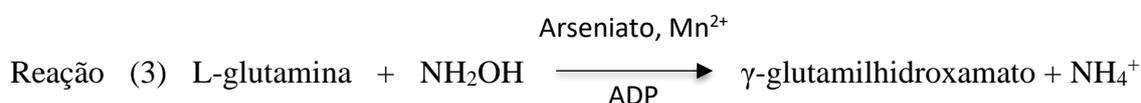
Como já mencionado anteriormente a GS catalisa a reação de assimilação de amônio em uma molécula de glutamato para formar glutamina, conforme mostrado na reação (1) a seguir:



A reação (1), *in vivo*, por estar relacionada com a assimilação do amônio, é conhecida como reação biossintética. Em condições *in vitro*, o amônio da reação (1) pode ser substituído por hidroxilamina, formando o intermediário γ -glutamilhdroxamato, conforme a reação (2) mostrada na sequência. Esse composto forma um complexo marrom quando na presença de ferro férrico em meio ácido, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria.



Ainda em condições *in vitro*, a GS é capaz de catalisar uma outra reação, conhecida com γ -glutamil transferase (γ -GT), na qual o grupo γ -glutamil da glutamina é transferido para a hidroxilamina, para formar, novamente, o γ -glutamilhdroxamato, conforme descrição da reação (3). Essa reação não envolve a hidrólise do ATP e o ADP é um cofator necessário.



1.3 Regulação pelo sistema Ntr

O sistema Ntr é o responsável pelo controle geral da regulação do metabolismo de nitrogênio em bactérias, estando melhor caracterizado até o momento em *E. coli*. O sistema é constituído pelas enzimas GlnD, pela família de PII e pelo sistema NtrB-NtrC [18]. A proteína bifuncional GlnD, codificada pelo gene *glnD*, possui uma função uridililtransferase/uridilil-removedora (UTase/UR), e é responsável por sensoriar os níveis de nitrogênio intracelular. Em condições de baixo nitrogênio e na presença de ATP e 2-oxoglutarato (2-OG), a enzima GlnD catalisa a uridililação das proteínas PII, e quando as concentrações de nitrogênio aumentam ela catalisa a desuridililação das mesmas [18,19]. Em *A. brasilense* as proteínas PII são codificadas por dois genes: *glnB*, codificador da proteína GlnB, e *glnZ*, codificador de GlnZ [20].

As proteínas PII são responsáveis pela transdução de sinal por meio de mudanças conformacionais na sua estrutura. Estruturalmente, as proteínas PII são homotrímeros

organizadas em forma de barril, onde cada monômero possui duas α -hélices e quatro folhas β que são ligados por um loop, conhecido como *loop-T*, de 19 aminoácidos, que possui sítio para modificação pós traducional, no resíduo de tirosina conservado (Y51), e é responsável pela modulação da interação de PII com suas proteínas-alvo (Fig. 3a) [21]. A regulação das proteínas PII também ocorre por meio de efetores alostéricos, e cada trímero possui três sítios de ligação para ATP ou ADP e 2-OG (Fig. 3b). O ATP e o ADP competem pelos mesmos sítios de ligação, e enquanto ATP e 2-OG agem de forma cooperativa, o ADP age de forma antagonista ao 2-OG. Em altas concentrações de 2-OG, a ligação cooperativa com ATP é favorecida, enquanto que em baixas concentrações de 2-OG a ligação de ADP é favorecida, podendo assim PII adotar duas conformações diferentes [21].

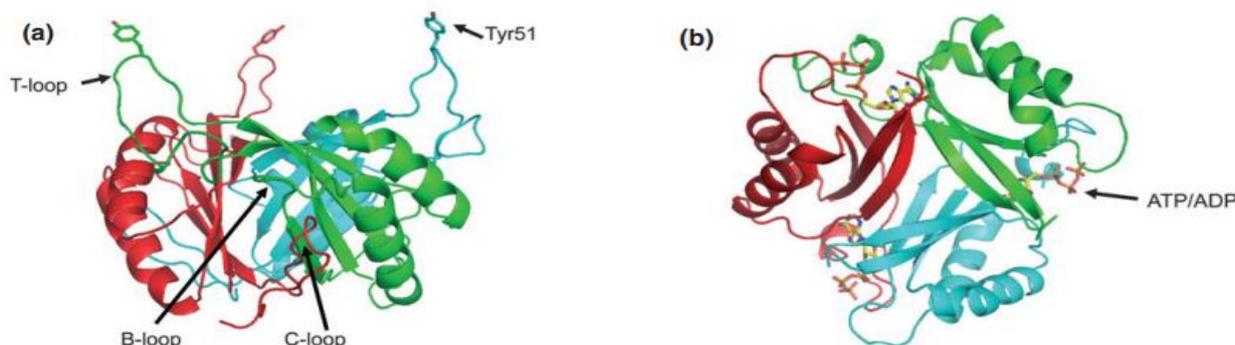


Figura 3. Modelo estrutural da proteína GlnB de *E. coli*. A proteína GlnB é pertencente a família das proteínas PII e possui um sítio para modificação pós traducional no resíduo de tirosina conservado (Y51) localizado no loop-T (a) e também pode ser regulada alostericamente por ATP/ADP e 2-OG (b). (Adaptado de 21)

Por fim, o controle geral da regulação dos genes da fixação de nitrogênio é realizado por um sistema de dois componentes, o NtrB-NtrC, que é extensivamente estudado em *E. coli*. Em baixas concentrações de nitrogênio, NtrB ativa NtrC por meio de uma fosforilação, e em condições onde o nitrogênio está suficiente, PII não se encontra em sua forma uridililada, assim interagindo com NtrB, que agora inativa NtrC por meio de uma desfosforilação [8, 21]. NtrC fosforilado é um ativador transcricional de genes como *glnA*, *glnB* e *glnZ*, de forma que em baixas concentrações de nitrogênio a síntese da proteína Glutamina sintetase é estimulada, elevando as concentrações intracelulares desta proteína [18].

Através da adenililação e desadenililação, em *E. coli*, a proteína GlnE realiza a regulação pós-traducional de GS. As proteínas PII e PII-UMP regulam as atividades adenililtransferase (ATase) e adenilil-removedora (AR) de GlnE, respectivamente, dependendo dos níveis de nitrogênio intracelular. Em condições de alto nitrogênio, a proteína GlnB é desuridilada pela proteína GlnD, assim estimulando GlnB formar um complexo com GlnE, dessa forma ativando sua atividade ATase, e consecutivamente, tendo como resultado uma baixa atividade de GS. Em baixas concentrações de nitrogênio, a proteína GlnD uridilila GlnB, dessa forma ativando a atividade adenilil-removedora de GlnE, que então remove os grupos adenilil de GS, tornando-a ativa [22].

Além da regulação das vias de assimilação de amônio, as proteínas PII também são responsáveis pela regulação da fixação de nitrogênio, controlando diretamente a atividade da nitrogenase ou pelo controle da transcrição dos genes *nif*, em resposta a concentração de nitrogênio fixado [23,24]. No caso da regulação transcricional dos genes *nif*, o mecanismo varia entre os microrganismos. Em condições onde o nitrogênio está limitante, nos microrganismos *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Rhodospirillum rubrum*, as proteínas PII são necessárias para a ativação de NifA. Em *A. brasilense*, a proteína GlnB é a responsável por essa regulação. Em condições de baixas concentrações de nitrogênio, GlnB-UMP₃ interage com o domínio GAF da NifA, permitindo assim, que esta ative a expressão dos genes *nif* [21]. GlnB e GlnB-UMP₃ competem pelo mesmo sítio de ligação em NifA, dessa maneira permitindo que a expressão dos genes *nif* responda rapidamente aos níveis de nitrogênio [25].

As proteínas PII são capazes de integrar o estado celular do nitrogênio e do carbono, níveis de 2-OG, com o estado energético, a razão ATP/ADP. Em adição a regulação do metabolismo de nitrogênio, foi descoberto que a enzima Acetil-CoA-carboxilase (ACC), que catalisa a primeira reação da síntese de ácidos graxos, também é um alvo de PII. Na maior parte das bactérias a ACC é composta pela biotina carboxilase (BC), proteína carreadora de biotina carboxil (BCCP) e carboxil-transferase (CT) [26]. A BC é a responsável pela primeira catálise, carboxilando a biotina que está ligada a BCCP. A segunda catálise é realizada por CT, que utiliza biotina carboxilada, que foi translocada por BCCP, como doadora do grupo carboxil, para carboxilar o acetil-CoA [26,27]. Foi observado, que tanto em *E. coli* quanto em *Arabidopsis thaliana*, a GlnB se liga em BCCP inibindo sua atividade ACC. Essa inibição é controlada pelos níveis de 2-OG, quando os níveis deste metabólito estão altos, a inibição de BCCP por GlnB é revertida [27].

O presente trabalho teve como objetivo fazer a caracterização *in vitro* da proteína GS de *A. brasilense*, bem como comparar as características funcionais entre as formas adenililada e não modificada dessa enzima.

2. Materiais e Métodos

2.1 Bactérias e plasmídeos

Duas estirpes de *E. coli* foram utilizadas, a TOP 10 (Invitrogen) para a replicação de plasmídeos e BL21 (DE3) (Invitrogen) [28] para a expressão de proteínas. Foram utilizados os plasmídeos *glnA-Tev2*, para a expressão de GS de *A. brasilense*, e *glnE-pET29*, para a expressão de GlnE de *A. brasilense*, ambos gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luciano Huergo (UFPR litoral).

2.2 Meios de cultura

As cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) e no meio sólido Luria-Bertani Ágar (LA) [28], descritos na tabela 1.

Tabela 1. Componentes dos meios de cultura LB e LA.

Componente	Meio LB (g/L)	Meio LA (g/L)
Extrato de levedura	5,0	5,0
Cloreto de Sódio	10,0	10,0
Triptona	10,0	10,0
Ágar bacteriológico	---	15,0

O meio mínimo M9 foi utilizado para a obtenção de GS em diferentes estados de modificação (Tabela 2). Para GS adenilada foi adicionado ao meio 20 mM de glutamina e para a não modificada 1 mM de NH₄Cl.

Tabela 2. Componentes do meio mínimo M9

Solução de sais M9 5X	Concentração (mM)	Meio M9	Concentração (mM)
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	7,5	Solução de sais M9 5X	250
NaCl	2,2	MgSO ₄	5
KH ₂ PO ₄	0,2	Glicose 20%	85
		CaCl ₂	10

2.3 Transformação bacteriana

Para a transformação das células bacterianas competentes, 5 µL de DNA plasmidial foram misturados a elas e mantidos no gelo por 30 min. Após esse período, as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 45 seg. Em seguida, foram

ressuspensas com 900 μL de meio LB e incubadas a 37°C por 30 min. Por fim, as células foram centrifugadas a 10.800 g por 1 min e plaqueadas em meio LA contendo o antibiótico adequado.

2.4 Expressão de proteínas

2.4.1 Teste de expressão *glnA*-Tev2

Pré-inóculos das células transformadas foram crescidos durante a noite em 3 mL de meio LB com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (LB-ampicilina). Posteriormente, 50 μL desta cultura foram transferidos para frascos contendo 5 mL de meio LB-ampicilina, e crescidos a 37°C sob agitação até OD_{600} em torno de 0,5. A expressão foi induzida com 50, 100 e 500 μM de IPTG (Isopropil-D-tiogalacopiranosídeo) por 3 horas a 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação 10 min a 10.800 g e estocadas a -20°C até o momento do uso. O resultado do teste de expressão foi visualizado por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

2.4.2 Expressão de GS em alto e baixo nitrogênio

Pré-inóculos das células transformadas foram crescidos durante a noite em 3 mL de meio LB com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente, 500 μL desta cultura foram transferidos para erlenmeyers contendo 50 mL de meio M9 com ampicilina. As condições de nitrogênio no meio foram dadas pela adição de 20 mM de glutamina, para a obtenção da GS adenililada, e adição de 1 mM de cloreto de amônio para obtenção de GS não modificada. As células foram crescidas a 37°C sob agitação até DO_{600} em torno de 0,5. A expressão foi induzida com 50 μM de IPTG por 3 horas a 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação 10 min a 10.800 g e estocadas a -20°C até o momento do uso.

2.4.3 Expressão de GlnE

As células transformadas foram crescidas durante a noite em pré-inóculos de 3 mL de meio LB. Posteriormente, 500 μL do pré-inóculo foram transferidos para frascos contendo 50 mL de meio LB e canamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram mantidas sob agitação a 37°C até DO_{600} em torno de 0,5. A expressão das proteínas foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 3 horas a 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação durante 10 min a 10.800 g e o pellet estocado a -20°C até o momento do uso.

2.5 Purificação de proteínas

Os *pellets* de células obtidos através de centrifugação, foram ressuspensos em 5 mL de tampão A (Tris-HCl pH 8,0 50 mM; NaCl 50 mM; Imidazol 20 mM) e a mistura obtida foi submetida à sonicação, com o intuito de lisar as células, por um período de 5 min e intervalos de pulso de 5 s. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 10.800 g por 10 min a 4°C.

As duas diferentes formas da proteína GS foram purificadas por meio de cromatografia de afinidade em coluna de resina HiTrap-Chelating-Ni²⁺(GE). A fração solúvel foi injetada na coluna e a proteína foi eluída em um gradiente de 20 a 1000 mM de imidazol em tampão B (Tris pH 8,0 50 mM; NaCl 50 mM; Imidazol 1000 mM). A proteína GlnE foi purificada por cromatografia de troca iônica. Nesse caso, foi utilizado o tampão A para troca iônica (NaCl 50 mM. Tris-HCl pH 8,0 50 mM). A fração solúvel foi injetada em uma coluna cromatográfica HiTrap-Heparina. As proteínas foram eluídas por gradiente de 20 a 1000 mM de NaCl em tampão B (NaCl 1000 mM; Tris pH 8,0 50 mM).

As frações que continham as proteínas purificadas foram dialisadas em duas etapas: na primeira contra tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0 e 50 mM NaCl durante a noite, e na segunda foram transferidas para tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de NaCl e 50% de Glicerol por, ao menos, 12h. Para a quantificação, foi realizada espectrofotometria em Nanodrop (Thermofisher).

2.6 Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida foi realizada em sistema vertical. A concentração do gel de separação utilizado foi de 12% (m/v) e era composto por Tris pH 8,8 0,3 M; SDS 1%; Acrilamida 12%; Persulfato de amônio 0,05% e TEMED e o gel de empilhamento composto por Tris pH 6,8 6 mM; SDS 0,05%; Acrilamida 4%; APS 0,05% e TEMED. As amostras foram misturadas com 5 µL tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 M de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e fervidas a 80°C por 5 min antes da aplicação para a desnaturação. A voltagem aplicada para a corrida foi de 170V. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

2.7 Ensaios de atividade biossintética de GS

Para os ensaios de atividade biossintética de GS, 40 μL de mix reacional (Imidazol pH 7,2 57 mM; Hidroxilamina 28 mM; MgCl_2 34 mM e Glutamato 97 mM) foi adicionado à 20 μL de água contendo GS na concentração indicada em cada experimento. A reação foi iniciada pela adição de ATP e aconteceu a 37°C por 60 min. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de Stop mix ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04 M, TCA 0,12 M e HCl 0,61 M). O produto da reação foi quantificado por espectrofotometria a 490 nm. A análise de cinética da atividade biossintética foi realizada com o *software* Prisma 9.

2.8 Ensaios de atividade γ -GT de GS

Para os ensaios de atividade γ -GT de GS, as reações foram realizadas conforme descritas previamente [29, 30]. As reações eram compostas por 20 μL que podiam ser a reação de desadenililação ou apenas GS e água, a elas foram adicionados 40 μL do mix γ -GT (Imidazol pH 6,5 77 mM; Hidroxilamina 11 mM; MnCl_2 0,17 mM; Arseniato de Potássio 14 mM; ADP 0,23 mM). Para a condição com magnésio foi adicionado MgCl_2 60 mM. A reação foi iniciada pela adição de Glutamina e a reação aconteceu a 37°C por 60 min. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de Stop Mix. O produto da reação, γ -glutamil-hidroamato, foi quantificado por espectrofotometria a 490 nm. A análise de cinética da atividade γ -GT foi realizada com o *software* Prisma 9.

2.9 Desadenililação de GS *in vitro*

Para a desadenililação de GS, 5 μL do mix de desadenililação (Tris pH 7,5 5mM; KH_2PO_4 25 mM; Soro Albumina Bovino (BSA) 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram adicionados à GS modificada e GlnE. Para avaliar possíveis influências de moduladores alostéricos, foram adicionados 5 mM de ATP, ADP e 2-OG conforme a necessidade. A reação aconteceu a 37°C por 20 min. Após esse período, foi adicionado o mix γ -GT.

2.10 Uridililação de GlnB *in vitro*

A uridililação de GlnB de *Herbaspirillum seropedicae in vitro* foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente [31], com modificações. Para realizar a

uridililação 200 μM de GlnB, gentilmente cedida pelo doutorando Eduardo Sabatine Lopes, foi adicionado ao mix de uridililação 66 μL de tampão Mg5x (Tris pH 7,5 500 mM; KCl 500 mM; MgCl_2 125 mM), 5 mM de 2-OG, 1 mM de UTP; 0,2 mM de ATP e 1 mM de GlnD, gentilmente cedida pela doutoranda Lorena Polizelli. A reação foi incubada a 37°C durante a noite. O progresso da uridililação foi acompanhada por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes. Por fim, GlnD foi inativada através de aquecimento a 70°C por 15 min.

3. Resultados e discussão

3.1 Expressão e purificação da GS de *A. brasilense*

3.1.1 Teste de expressão

Com intuito de se obter a melhor condição de expressão para a proteína GS de *Azospirillum brasilense*, a *E. coli* BL21 transformada com o plasmídeo *glnA*-Tev2 foi crescida em meio LB, e a superexpressão de GS foi induzida mediante a adição de IPTG nas concentrações de 50, 100 e 500 μ M às culturas em estado exponencial de crescimento, para que a melhor concentração de indutor fosse determinada. A proteína superexpressa foi extraída e analisada em gel de SDS-PAGE (Fig. 4).

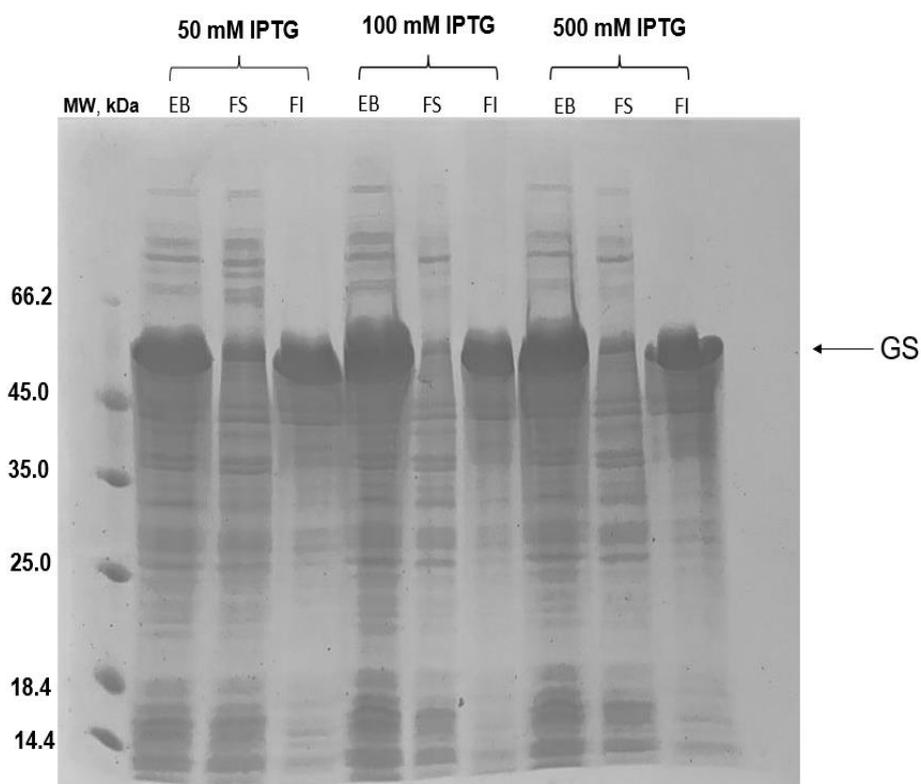


Figura 4. Teste de expressão da proteína GS de *A. brasilense*. Eletroforese em gel de poliácridamida 12% do extrato bruto (EB), fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI) dos testes de expressão de *glnA*-Tev2. A expressão foi induzida com três concentrações de IPTG, sendo elas 50, 100 e 500 μ M.

É possível observar o enriquecimento de bandas de proteína superexpressa nas frações bruto e solúvel com massa semelhante a teórica de GS, 52 kDa, em todas as condições de concentração de IPTG. Outro resultado positivo obtido é a presença da proteína em abundância na fração solúvel, sendo importante para a purificação da mesma.

Dessa forma, foi definida a concentração de 50 μ M de IPTG para todas as induções a diante no trabalho.

O presente trabalho tinha como objetivo purificar a enzima GS de *A. brasilense* nos estados adenilada e não modificada para então caracterizar essas duas formas. Logo, era necessário determinar condições de expressão as quais permitissem a expressão de GS nos dois estados. Para isso, nós testamos a expressão da proteína em meio M9 suplementado com diferentes fontes e quantidades de nitrogênio, e verificamos o estado de modificação pós-traducional da GS de forma indireta, pela inibição da atividade γ -glutamil transferase (γ -GT) por íons Mg^{2+} . Esse experimento permite inferir o estado de modificação pós-traducional da GS, já que diversos trabalhos anteriores mostram que a atividade γ -GT de GS adenilada é inibida por íons Mg^{2+} , enquanto essa inibição não é observada para a GS não modificada [29]. Os resultados indicaram que a GS foi expressa na forma adenilada quando a fonte de nitrogênio era 20 mM de glutamina, e não adenilada quando a fonte de nitrogênio era 2 mM de NH_2Cl (Figura 5).

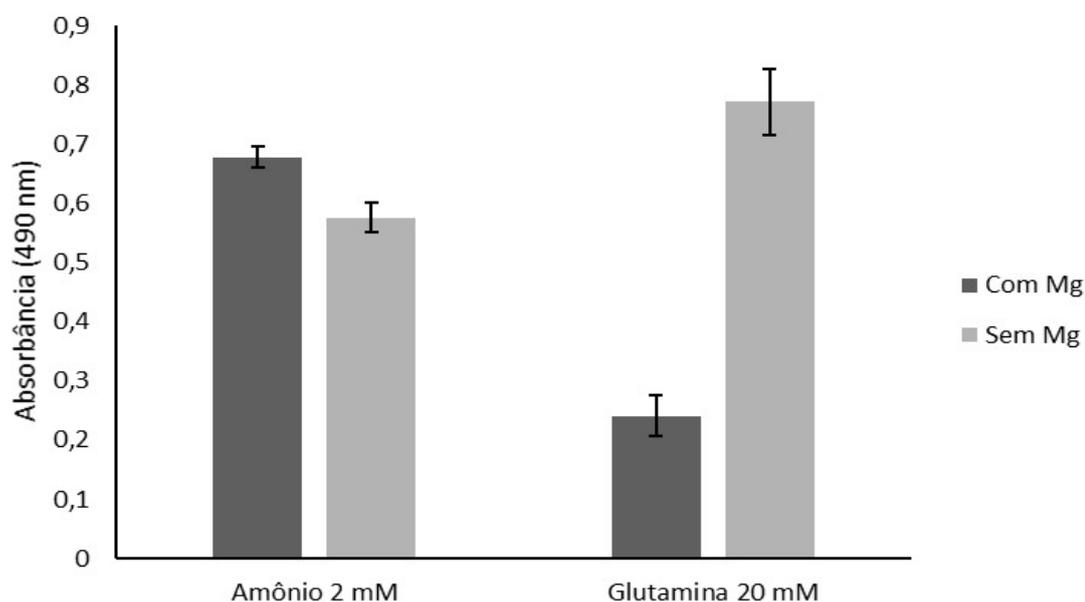


Figura 5 – Determinação da condição para expressão das diferentes formas de GS. As células foram crescidas em meio M9 suplementando com a fonte de nitrogênio indicada e a superexpressão proteica induzida com IPTG. As células foram coletadas, lisadas e 20 μ L do extrato solúvel usado para a reação. Os dados representam a média de duplicatas de reação γ -GT.

Considerando os resultados mostrados na Figura 5, a partir desse ponto chamaremos a GS expressa em meio contendo 20 mM de glutamina de GS-AMP, ou GS adenilada, e a GS expressa em meio contendo 1 mM de NH_4Cl apenas de GS, ou GS não modificada.

3.1.2 Purificação da GS de *A. brasilense*

Uma vez determinadas as melhores condições de expressão, nós partimos para a purificação das duas formas de GS. Um pré-inóculo da BL21 transformada com o plasmídeo *glnA-Tev2* foi crescida em meio LB, o qual foi inoculado em 50 mL de meio M9 contendo 20 mM de glutamina ou 1 mM de NH_4Cl . Os géis de eletroforese das purificações são mostrados na figura 6.

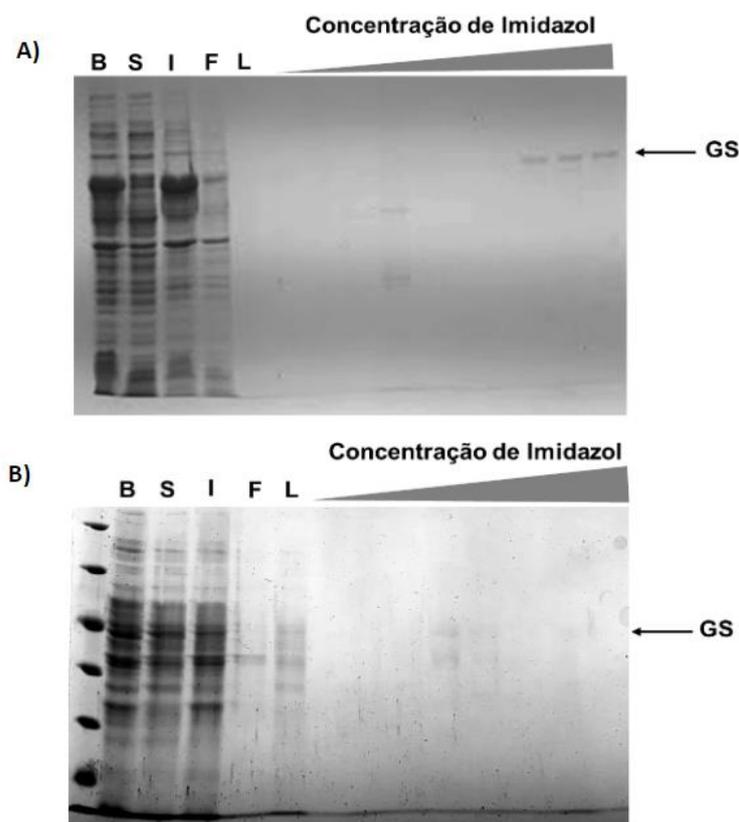


Figura 6 – Purificação das enzimas GS-AMP e GS de *A. brasilense*. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue. A linha B contém o extrato bruto, S fração solúvel, I fração insolúvel, F o não ligado na coluna, L a lavagem e em seguida as frações eluídas em concentrações crescentes de Imidazol. A posição da GS é mostrada ao lado. A. Purificação da GS-AMP. B. Purificação da GS não modificada.

A purificação das duas formas de GS de *A. brasilense*, mostradas na figura 6, indica que o rendimento parece ter sido maior para a GS-AMP. De fato, a quantificação da GS-AMP mostrou uma concentração de 0,3 mg/mL, e para a GS não modificada 0,1 mg/mL. No entanto, mesmo a preparação de GS não modificada, que parece bem fraca na figura 6B, mostrou uma alta atividade *in vitro*, conforme demonstram os resultados mostrados na sequência.

3.2 Caracterização da atividade da GS

As preparações da proteína GS foram submetidas às reações biossintética e γ -Glutamil Transferase (γ -GT), para que sua atividade pudesse ser caracterizada.

3.2.1 Curva de concentração de GS

Inicialmente, para verificar a atividade das preparações de GS do presente trabalho e determinar a concentração de enzima a ser utilizada nos diferentes ensaios funcionais, nós testamos a reação biossintética e a reação γ -GT em diferentes concentrações de enzima. Tanto a reação biossintética quanto a reação γ -GT permitem inferir indiretamente o estado de modificação pós-traducional da GS. Através da reação biossintética essa inferência é possível porque a GS apresenta diferente especificidade para o metal divalente presente no meio reacional: a atividade biossintética da proteína adenililada é maior na presença de Mn^{2+} , enquanto que a da proteína não modificada é maior na presença de Mg^{2+} . Por isso, a atividade biossintética das enzimas GS e GS-AMP foi testada na presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} , conforme mostrado na figura 7. Esses resultados corroboraram a determinação do estado de modificação pós-traducional previsto no ensaio de expressão mostrado anteriormente.

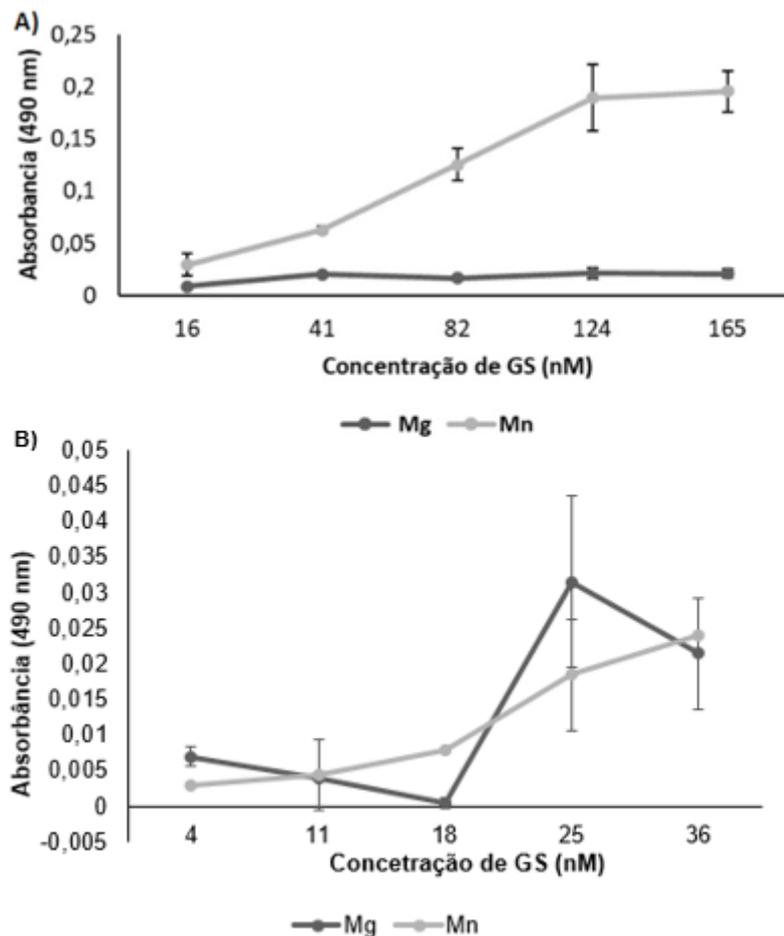


Figura 7. Curva de concentração de GS na atividade biossintética. As reações foram realizadas nas concentrações da proteína indicadas no gráfico e disparadas com ATP na presença de $MgCl_2$ ou $MnCl_2$. A. GS-AMP B. GS.

Da mesma forma, com a reação γ -GT também é possível inferir o estado de modificação de GS. Nessa reação o estado de modificação é determinado na presença e na ausência de Mg^{2+} , uma vez que a atividade da proteína modificada é inibida pela presença desse íon. Dessa maneira, GS adenilada é inibida em altas concentrações de Mg^{2+} (60 mM). Novamente, os resultados da inibição da atividade γ -GT por íons Mg^{2+} confirmaram o estado de modificação pós-traducional das proteínas expressas em meio com glutamina 20 mM (Figura 8A) e amônio (Figura 8B).

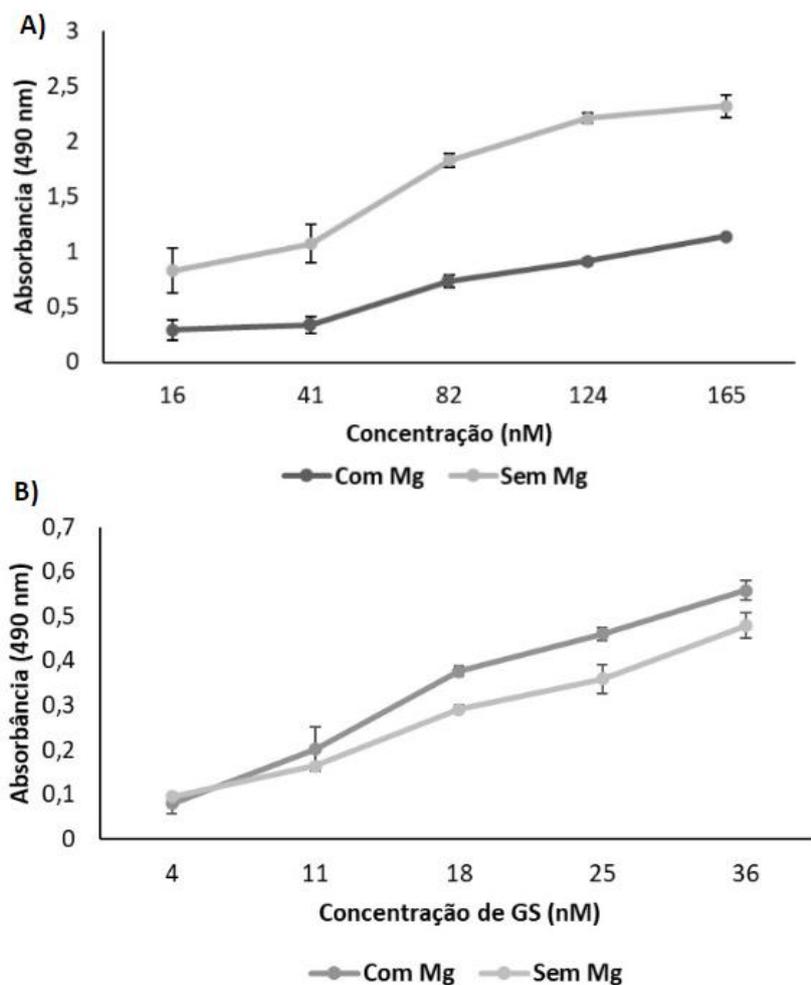


Figura 8. Curva de concentração de GS na atividade γ -GT. As reações foram realizadas diferentes nas concentrações da proteína indicadas no gráfico e disparadas com glutamina na presença e na ausência de $MgCl_2$. A. GS-AMP B. GS não modificada.

3.2.2 Curva de concentração de substratos

A reação biossintética tem como seus substratos ATP e glutamato. Com o intuito de estudar a cinética da GS de *A. brasilense* para cada substrato, em reações separadas, o ATP e o glutamato foram variados num intervalo de 0 a 20 mM utilizando apenas a GS-AMP. Através da curva de concentração de ATP na atividade biossintética (Fig. 9A) observa-se que na presença de magnésio houve uma diminuição na atividade da proteína com um aumento da concentração de substrato, indicando uma possível inibição por substrato. Na curva de concentração de glutamato na atividade biossintética (Fig. 9B), na presença de manganês, na medida que a concentração do substrato aumenta, a atividade da enzima também é aumentada, mas quando o íon presente na reação é o magnésio,

porque a proteína está altamente adenilada, mesmo com o aumento da concentração do glutamato a reação praticamente não é observada.

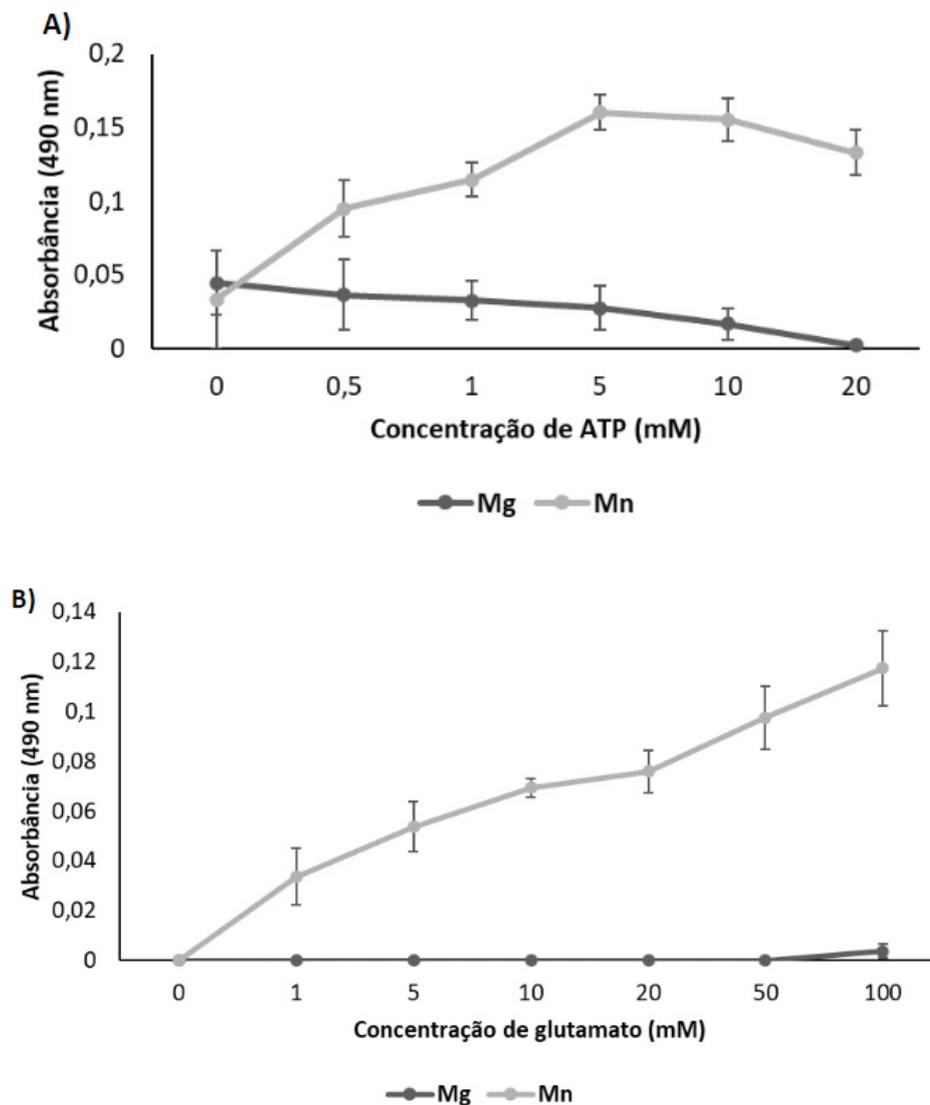


Figura 9. Atividade biossintética da GS-AMP em diferentes concentrações de substrato. A) variação da concentração de ATP. B) variação de concentração de glutamato.

A reação γ -GT tem como um de seus substratos a glutamina, que assim como para a reação biossintética para o ATP, sua concentração foi variada entre 0 e 20 mM, e a partir dos resultados obtidos, podemos observar que com o aumento da concentração de glutamina, em ambas as condições de com e sem magnésio, a proteína GS teve sua atividade aumentada (Fig.10).

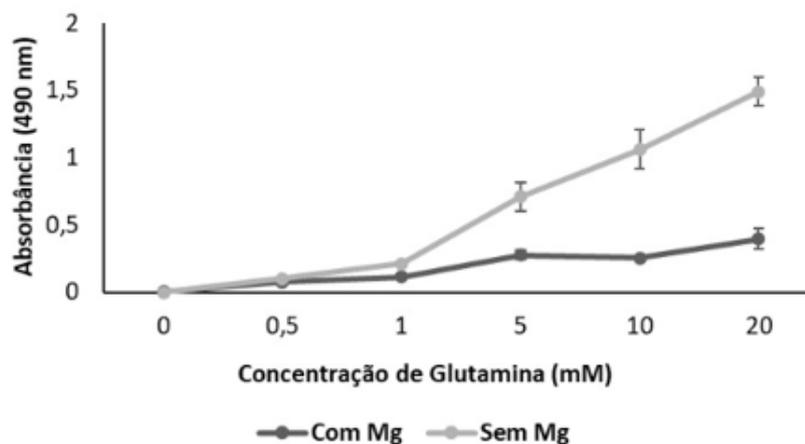


Figura 10 - Curva de concentração de substrato. Variação de concentração de glutamina, para a reação γ -GT. As reações aconteceram a 37°C e após o período de 1h foram paradas com 100 μ L de *Stop mix*

Os dados de atividade da biossintética da proteína GS-AMP na presença de íons Mn^{2+} , mostrados nas figuras 9A (curva de ATP) e 9B (curva de Glutamato) e de atividade γ -GT na ausência de íons Mg^{2+} da figura 10 (curva de glutamina) foram então fitados contra o modelo de cinética de Michaelis-Menten (Figura 11), e os parâmetros cinéticos calculados (Tabela 3).

Para a reação biossintética, os resultados indicaram que a GS possui um K_m na ordem de 10X menor para o ATP do que para o glutamato. De fato, para o glutamato (Figuras 9B e 11C), a saturação completa não foi observada mesmo na máxima concentração de substrato testada, de 100 mM. Para o ATP, ao contrário, a saturação já foi visualizada quando o substrato estava próximo de 5 mM (Figuras 9A e 11B). Para γ -GT, o K_m da glutamina foi ainda maior do que para o glutamato na reação Biossintética, no entanto essa reação apresentou uma velocidade máxima na ordem de 10X maior do que na reação biossintética.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos da enzima GS-AMP de *A. brasilense*

Substrato	Reação	Condição	K_m (mM)	K_{cat} (min^{-1})
Glutamina	γ -GT	Sem Mg^{2+}	$11,64 \pm 2,015$	$0,31 \pm 0,02$
ATP	Biossintética	Com Mn^{2+}	$0,3015 \pm 0,1204$	$0,02 \pm 0,0012$
Glutamato	Biossintética	Com Mn^{2+}	$5,433 \pm 1,36$	$0,015 \pm 0,0008$

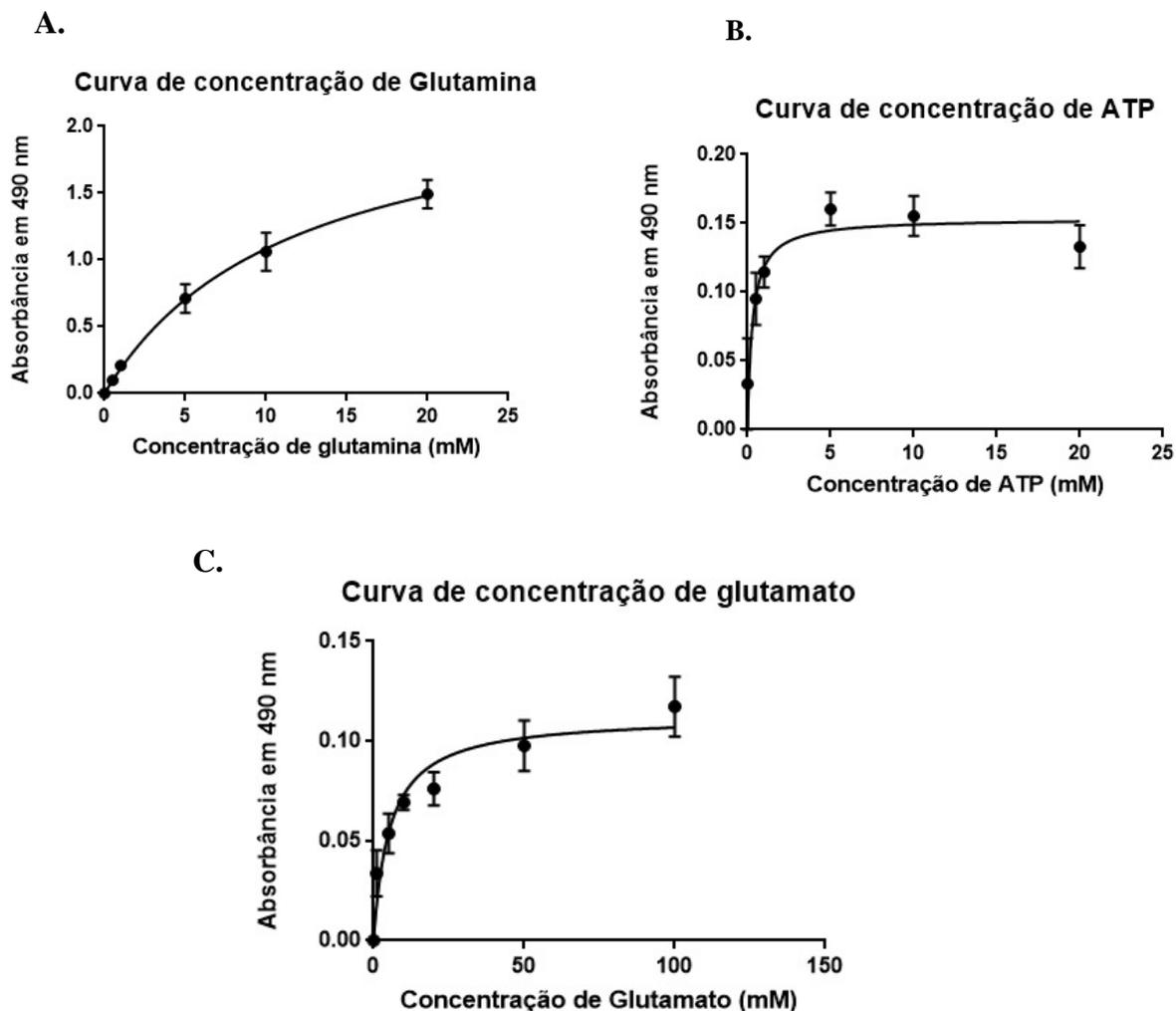


Figura 11 – Ajuste dos dados de atividade da enzima GS-AMP à cinética de Michaelis-Menten. A) Atividade Biossintética com Mn^{2+} , curva de glutamina. B) Atividade Biossintética com Mn^{2+} , curva de ATP. C) Atividade γ -GT na ausência de Mg^{2+} , curva de Glutamato.

3.2.3 Curvas de pH

Seguindo com a prospecção das melhores condições de verificação da atividade *in vitro* das preparações de GS de *A. brasilense*, nós testamos as atividades biossintética e γ -GT das preparações GS e GS-AMP. Os resultados estão mostrados nas figuras 12 (biossintética) e 13 (γ -GT).

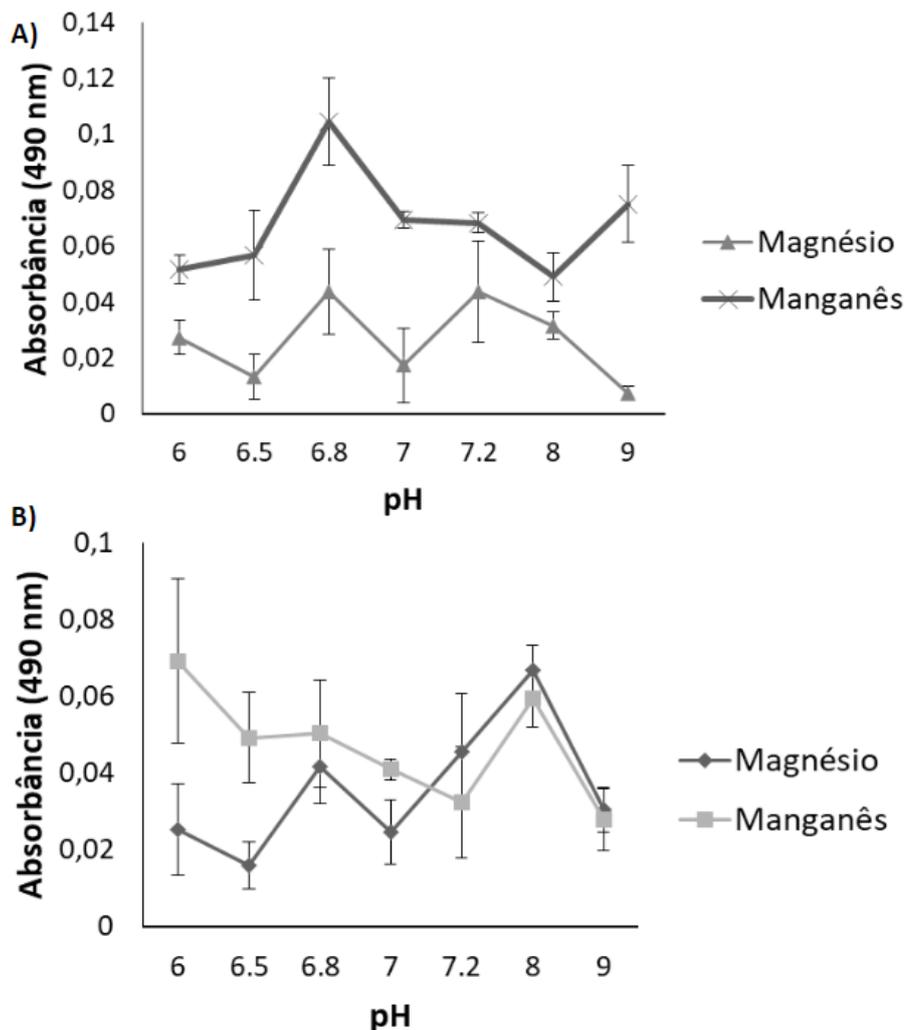


Figura 12 – Curva de pH da atividade Biossintética das preparações de GS. As reações foram realizadas nos diferentes pHs indicados no gráfico e disparadas com ATP na presença de $MgCl_2$ ou $MnCl_2$ A. GS-AMP. B. GS não modificada.

O resultado mostrado na figura 12 indica que a reação biossintética varia pouco de acordo com o pH. No entanto, para a proteína GS-AMP (Figura 12A) foi possível determinar um pH ótimo de 6,8, tanto para a reação contendo Mg^{2+} , quanto para a reação contendo Mn^{2+} . Para a GS não modificada a indicação do pH ótimo não foi clara. Além disso, para essa preparação, foi possível observar que a diferença na atividade das reações na presença de Mn^{2+} e Mg^{2+} , frequentemente utilizada para inferir o estado de modificação pós-traducional de GS, diminuiu nos pHs mais altos testados. Portanto, nós indicamos aqui que a dedução do estado de adenililação da GS de *A. brasilense* pela atividade na presença de Mn^{2+} ou Mg^{2+} seja feita no pH 6,0.

Na figura 13 é mostrada a curva de pH da reação γ -GT das duas preparações de GS. Para a GS-AMP (Figura 13A), o pH ótimo encontrado é entre 6,8 e 7,0, sendo mais conspícuo na reação sem íons Mg^{2+} , já que esses íons inibem a reação γ -GT da enzima adenilada. Para a reação γ -GT da GS não modificada, o pH ótimo na ausência de íons Mg^{2+} foi próximo de 8,0, e na presença de Mg^{2+} foi 7,2.

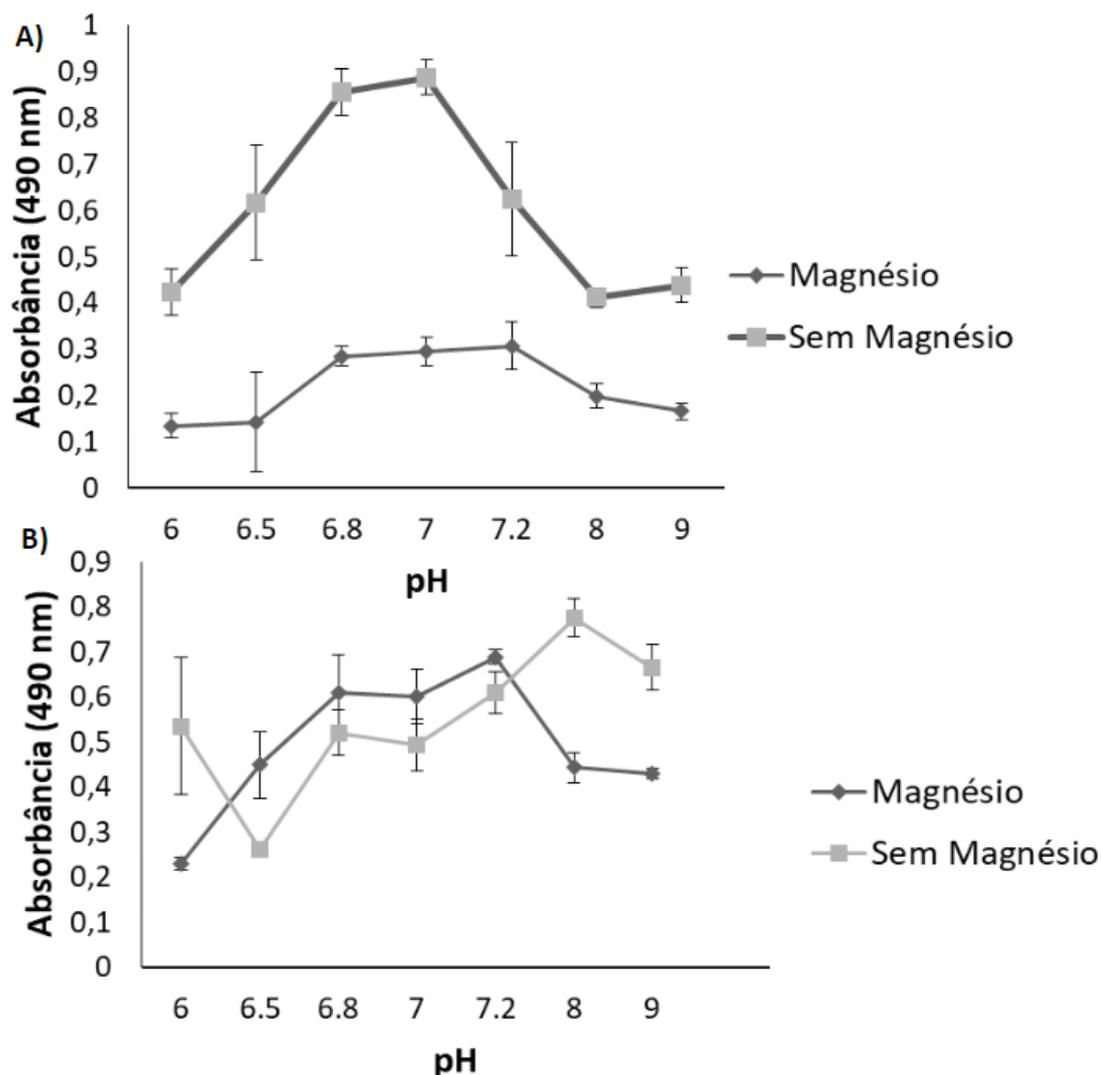


Figura 13 – Curva de pH da atividade γ -GT das preparações de GS. As reações foram realizadas nos diferentes pHs indicados no gráfico e disparadas com glutamina na presença ou ausência de $MgCl_2$ 60 mM. A. GS-AMP. B. GS não modificada.

Em *E. coli*, a atividade γ -GT na ausência de íons Mg^{2+} das proteínas adenilada e não adenilada “se cruzam” no gráfico de curva de pH, e o ponto onde as curvas se

encontram é chamado de ponto de isoatividade [29]. Para determinar o ponto de isoatividade das preparações de GS de *A. brasilense* desse trabalho, nós plotamos a curva de pH da atividade γ -GT na ausência de Mg^{2+} . O resultado está mostrado na figura 14.

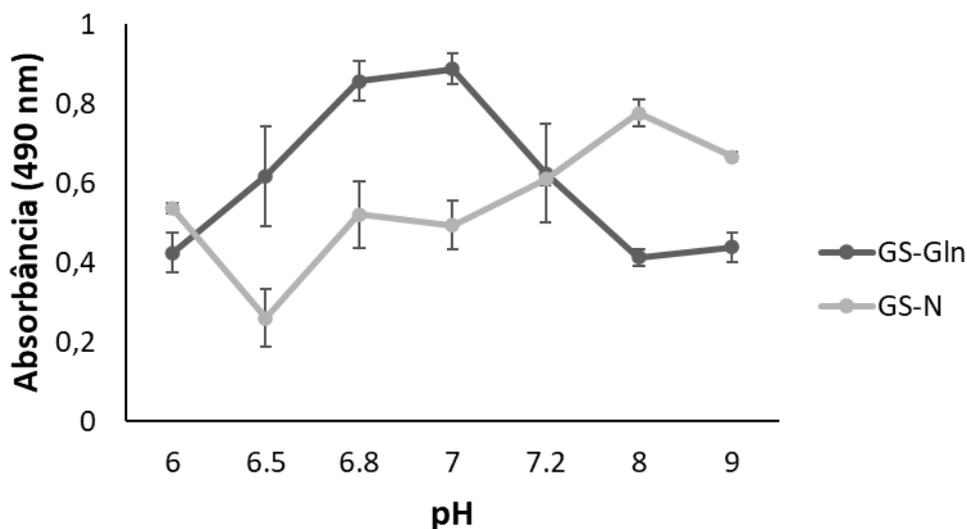


Figura 14 – Curva de pH da atividade γ -GT das preparações de GS. As reações foram realizadas nos diferentes pHs indicados no gráfico e disparadas com glutamina na ausência de $MgCl_2$ 60 mM.

A figura 14 mostra que a GS de *A. brasilense* tem um perfil semelhante ao encontrado anteriormente para *E. coli*, e as curvas da variação do pH da atividade γ -GT se cruzam no gráfico. O ponto de isoatividade da GS de *A. brasilense* determinado aqui é de aproximadamente 7,2, enquanto que em *E. coli* é de 7,6 [29].

3.3 Caracterização da atividade adenilil removedora (AR) da GlnE de *A. brasilense*.

A enzima GlnE é a responsável pela adição e remoção dos grupamentos adenilil de GS. Neste trabalho nós purificamos a enzima GlnE de *A. brasilense* e verificamos a atividade AR exercida sobre a GS-AMP.

Aqui, a reação de desadenilação de GS-AMP por GlnE de *A. brasilense* foi realizada na presença de efetores, sendo eles ATP, ADP e 2-OG, em uma concentração final de 5 mM. O estado de modificação pós-traducional de GS foi inferido por meio da

inibição de íons Mg^{2+} da reação γ -GT. Foi possível observar que, quando comparado aos controles sem GlnE e sem efetor, a GlnE catalisou a desadenililação de GS-AMP na presença de todos os efetores. No entanto, quando a reação ocorre na presença de ATP e 2-OG juntos, a desadenililação de GS aparentemente é maior do que nas outras condições (Fig. 15), sugerindo um efeito sinérgico desses dois efetores.

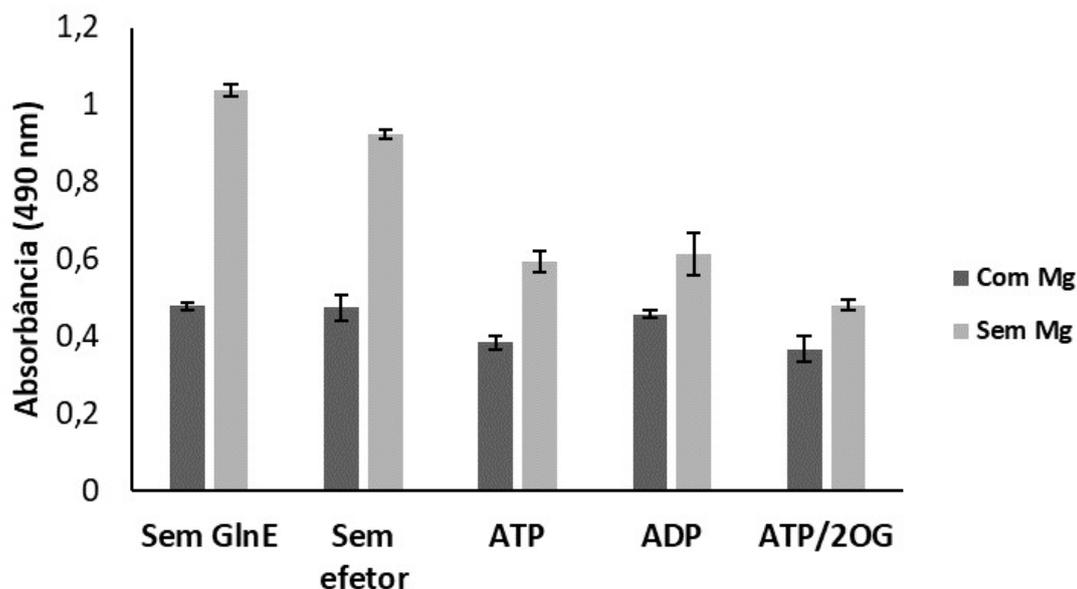


Figura 15. Reação de desadenililação de GS por GlnE. Para a reação foram utilizados 80 nM de GS e 2 nM de GlnE, os efetores foram utilizados na concentração final de 5 mM. A reação foi disparada com 14 mM de glutamina a 37°C e após o período de 1h foram paradas com 100 μ L de Stop mix.

3.3.1 Efeito de GlnB e GlnB-UMP₃ sobre a desadenililação de GS por GlnE

Com o intuito de avaliar a influência das proteínas PII sobre a atividade AR de GlnE de *A. brasilense*, nós testamos essa atividade na presença de GlnB não modificada e GlnB uridililada de *H. seropedicae*. A proteína GlnB de *H. seropedicae* possui alta homologia com a GlnB de *A. brasilense*. Através dos gráficos obtidos (Fig. 16), foi possível observar que GlnB e GlnB-UMP₃ de *H. seropedicae* não possuem influência na desadenililação de GS por GlnE, ambas de *A. brasilense*.

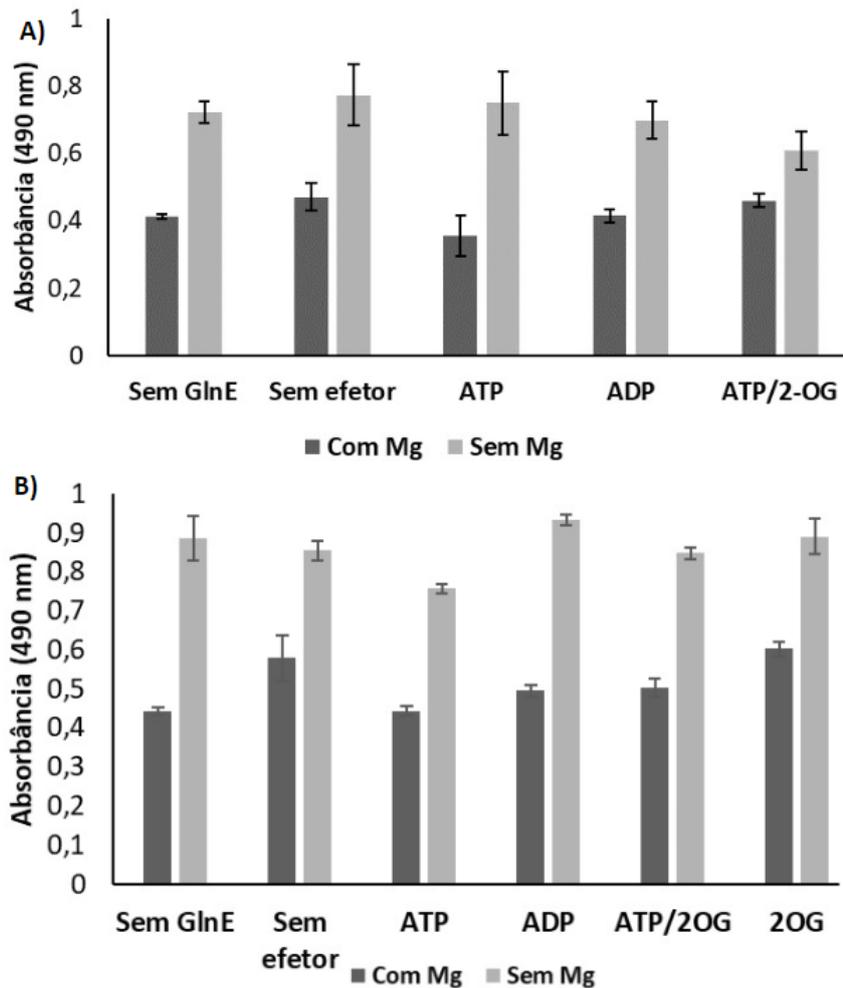


Figura 16. Reação de desadenilação de GS por GlnE na presença de GlnB e GlnB-UMP₃ de *H. seropedicae*. Para a reação foram utilizados 80 nM de GS, 2 nM GlnE e 20 nM GlnB ou GlnB-UMP₃, os efetores foram utilizados na concentração final de 5 mM. A reação foi disparada com 14 mM de glutamina e a 37°C e após o período de 1h foram paradas com 100 µL de Stop mix. A) reação de desadenilação na presença de GlnB. B) reação de desadenilação na presença de GlnB-UMP₃.

Para explorar melhor os detalhes da sensibilidade da atividade AR da GlnE de *A. brasilense* aos efetores testados, nós testamos a atividade em diferentes concentrações dos efetores. Os resultados são mostrados na figura 17 em função da atividade γ -GT na ausência de Mg²⁺.

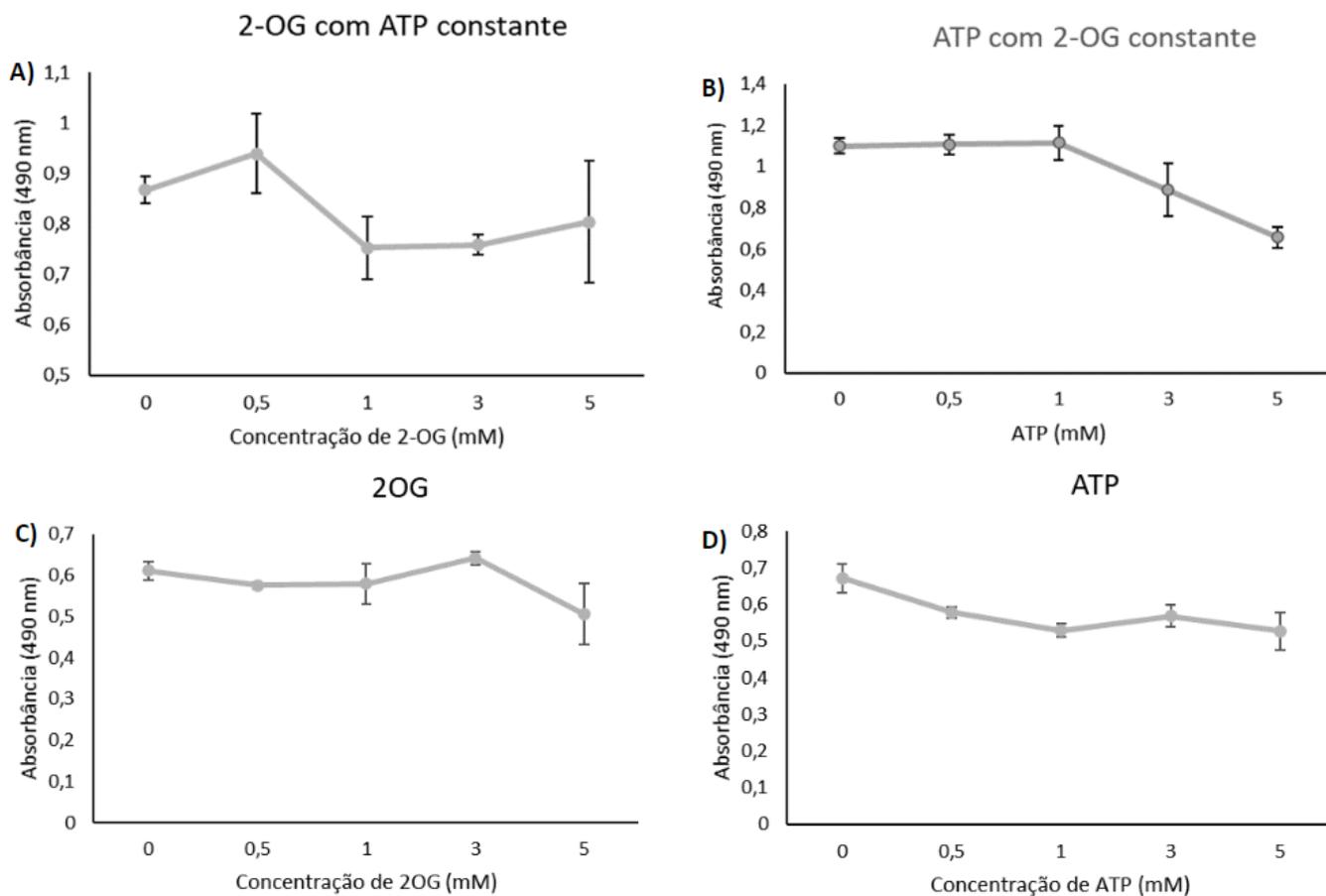


Figura 17 - Reação de desadenililação de GS por GlnE na presença de diferentes concentrações de efetores. Para a reação foram utilizados 80 nM de GS e 20 μ M GlnE. A reação foi disparada com 14 mM de glutamina e a 37°C e após o período de 1h foram paradas com 100 μ L de Stop mix. A. Curva de 2-OG na presença de ATP 5 mM. B. Curva de ATP na presença de 2-OG 5 mM. C. Curva de 2-OG. D. Curva de ATP.

Os resultados mostrados na figura 17 indicam que de fato ATP e 2-OG são capazes de estimular a atividade AR da GlnE de *A. brasilense*, no entanto um papel sinérgico entre ATP e 2-OG parece claro. Chama atenção que ATP e 2-OG são os mesmos efetores que agem de modo sinérgico no sítio alostérico das proteínas PII. Então, no caso do sistema regulatório GlnE-GS de *A. brasilense*, mesmo não tendo a participação das proteínas PII, os mesmos sinais que medeiam a interação destas com as proteínas-alvo parecem regular diretamente a GlnE.

Os resultados aqui mostrados indicam que a atividade AR da GlnE de *A. brasilense* parece ser regulada através de um mecanismo novo, não descrito anteriormente para nenhum outro organismo. A atividade AR da enzima GlnE já foi bem estudada em *E. coli*, *Rhodospirillum rubrum* e *H. seropedicae* [32, 33, 34, 30, 12]. Em *E. coli* a atividade AR de GlnE é ativada por GlnB uridililada, ATP e 2-OG, e inibida por GlnB não modificada [32, 33]. Em *R. rubrum*, nem as proteínas PII, nem efetores alostéricos foram encontrados regulando a atividade AR da enzima GlnE, indicando que essa atividade poderia ser a atividade basal de GlnE de *R. rubrum* [34]. Em *H. seropedicae*, as proteínas PII também parecem não exercer qualquer efeito regulatório sobre a atividade AR, e o sinal regulatório dominante é a razão ATP/ADP [30, 12]. Aqui, a atividade AR da GlnE de *A. brasilense*, da mesma forma, não foi regulada pelas proteínas PII testadas, e foi estimulada por ATP, ADP e 2-OG, sendo que a ativação máxima na combinação ATP e 2-OG (Figura 15). Esse resultado precisa ser visto com reservas, já que a GlnB de *A. brasilense* não foi testada e, mesmo com a alta identidade entre as proteínas, é possível que a PII de *H. seropedicae* não tenha sido capaz de substituir a proteína ortóloga de *A. brasilense*. Esses experimentos serão realizados no futuro.

4. Considerações finais

No presente trabalho, a proteína GS de *A. brasilense* foi superexpressa em sistema heterólogo, purificada e sua atividade *in vitro* caracterizada. Utilizando variações nas fontes de nitrogênio oferecidas ao hospedeiro da superexpressão, nós fomos capazes de purificar a GS em duas formas diferentes: não modificada e adenililada. Esse estado de modificação pós-traducional foi revelado através de ensaios funcionais. A proteína GlnE de *A. brasilense* também foi purificada, e sua atividade AR caracterizada. O trabalho aqui apresentado fornece ferramentas para o estudo *in vitro* detalhado do metabolismo de assimilação de amônio em *A. brasilense*.

5. Referências

1. Okon, Y.; Vanderleyden, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News** v. 63, p. 366-370, 1997.
2. Gullett, J.; O'Neal, L.; Mukherjee, T.; Alexandre, G. *Azospirillum brasilense*: Laboratory Maintenance and Genetic Manipulation. **Curr Protoc Microbiol.** 2017 Nov 9;47:3E.2.1-3E.2.17. doi: 10.1002/cpmc.39. PMID: 29120483.
3. Huergo, L. F.; Monteiro, R. A.; Bonatto, A. C.; Rigo, L. U.; Steffens, M. B. R.; Cruz, L. M.; Chubatsu, L.S; Pedrosa, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **CASSÁN, FD; GARCIA DE SALAMONE, I. Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 17-35. 2008**
4. Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS microbiology reviews.** v.24, n.4, p.487-506, 2000.
5. Döbereiner, J.; Pedrosa, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in Nonleguminous. **Crop plants.** New York: Sci.Tech.Publishers/Springer-Verlag. p.155, 1987.
6. Araújo, R. M.; Araújo, A. S. F. de; Nunes, L. A. P. L.; Figueiredo, M. do V. B. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural,** v. 44, n.9, p.1556–1560, 2014. doi:10.1590/0103-8478cr20130355
7. Barbosa, J. Z.; Hungria, M.; Sena, J. V. S.; Poggere, G.; Reis, A. R.; Corrêa, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium spp.* in Brazil, **Applied Soil Ecology,** v. 163, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>
8. Merrick, M. J.; Edwards, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Reviews,** v. 59, p. 604-622, 1995.
9. Helling, R.B. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** 1998 Sep;180(17):4571-5. doi: 10.1128/JB.180.17.4571-4575.1998. PMID: 9721297; PMCID: PMC107469.
10. Reitzer, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.,** v. 57, p. 155-176, 2003.
11. Helling, L.B., Why Does *Escherichia coli* Have Two Primary Pathways for Synthesis of Glutamate? **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 4664-4668, 1994.
12. Lopes, E.S. Regulação in vitro da enzima GlnE de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá), 2021.
13. Almassy, R.J.; Janson, C.A.; Hamlin, R. et al. Novel subunit-subunit interaction in the structure of glutamine synthetase. **Nature,** v.323, p.25, 1986.

14. Eisenberg, D.; Gill, H. S.; Pfluegl, G. M. U.; Rotstein, S. H. Structure--function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.1477, p.122–145. 2000.
15. Kamnev, A. A.; Antonyuk, L. P.; Smirnova, V. E.; Kulikov, L. A.; Perfiliev, Y. D.; Kudelina, I. A.; Vértés, A. Structural characterization of glutamine synthetase from *Azospirillum brasilense*. **Biopolymers**, v.74, p.64–68, 2004. doi:10.1002/bip.20045
16. Schnabel, T.; Sattely, E. Engineering posttranslational regulation of glutamine synthetase for controllable ammonia production in the plant symbiont *Azospirillum brasilense*. **Appl Environ Microbiol.** v.87, n. 14, 2021. <https://doi.org/10.1128/AEM.00582-21>.
17. Stadtman, E. R.; Ginsburg, A. The Glutamine Synthetase of *Escherichia coli*: **Structure and Control The Enzymes**, v.10, p.755-807, 1974
18. Kukolj, C.; Pedrosa F. O.; de Souza G. A.; Sumner, L. W.; Lei, Z.; Sumner, B.; do Amaral, F. P.; Juexin, W.; Trupti, J.; Huergo, L. F.; Monteiro, R. A.; Valdameri, G.; Stacey, G.; de Souza E. M. Proteomic and Metabolomic Analysis of *Azospirillum brasilense ntrC* Mutant under High and Low Nitrogen Conditions. **J Proteome Res.** 2020 Jan 3;19(1):92-105. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00397. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31599156.
19. Zhang, Y.; Burris, R. H.; Ludden, P. W.; Roberts, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v.152, p.195–204,1997.
20. Araujo, L. M.; Huergo, L. F.; Invitti, A. L.; Gimenes, C. I.; Bonatto, A. C.; Monteiro, R. A.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O.; Chubatsu, L. S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Br. J. Med. Biol. Res.** v.41, p. 289–294, 2008.
21. Huergo, L.F.; Chandra, G; Merrick, M. P_{II} signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiol Rev**, v.37, p.251-283, 2013 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00351.x>
22. Jiang, P.; Pioszak, A.A.; Ninfa, A.J. Structure-Function Analysis of Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*. **Biochemistry** v.46, p.4117-4132, 2007.
23. Huergo, L.F.; Pedrosa, F.O.; Santos-Muller, M; et al. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, v. 159, p. 176-190, 2012.
24. Dixon, R.; Kahn, D.; Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004
25. Huergo, L.F.; Filipaki, A.; Chubatsu, L.S.; Yates, M.G.; Steffens, M.B.; Pedrosa, F.O.; Souza E.M. Effect of the overexpression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett**, v.253, p. 47–54, 2005.
26. Gerhardt, E. C. M.; Rodrigues, T. E.; Müller-Santos, M.; Pedrosa, F. O.; Souza, E. M.; Forchhammer, K.; Huergo, L. F. The bacterial signal transduction protein GlnB

regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl CoA carboxylase. **Mol. Microbiol.** v.95, p. 1025–1035, 2015

27. Rodrigues, T. E.; Gerhardt, E. C. M.; Oliveira, M.A.S.; Chubatsu, L.S.; Pedrosa, F. O.; Souza E. M.; Souza, G. A.; Müller-Santos, M.; Huergo, L. F. Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner. **Mol. Microbiol.** v. 91, p. 751–761, 2014.

28. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

29. Bender, R. A.; Janssen, K.A; Resnick, A. D. et al Biochemical Parameters of Glutamine Synthetase from *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.** v. 129, p. 1001-1009, 1977

30. Tomazini, L.F. Regulação do estado de modificação pós-traducional da Glutamina Sintetase de *Herbaspirillum seropedicae* **Dissertação de Mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá), 2020.

31. Oliveira, M. A. S.; Gerhardt, E. C. M.; Huergo, L. et al. 2-oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. **The FEBS Journal**, v.282 p.4797-1809, 2015.

32. Jaggi, R.; van Heeswijk, W. C.; Westwehoff, H.V. et al. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **The EMBO Journal**, v.16, p5562- 5571,1997.

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

34. Jonsson, A.; Teixeira, P.F.; Nordlund, S.; The activity of adenylyltransferase in *Rhodospirillum rubrum* is only affected by α -ketoglutarate and unmodified PII proteins, but not glutamine, in vitro. **The FEBS Journal**, v. 274, p.2449-2460, 2007.