

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

EDUARDO LÊNNYN DOS SANTOS CAMPOS

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ESTIRPE DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae* MUTANTE NO GENE *glnE*

Maringá

2021

EDUARDO LÊNNYN DOS SANTOS CAMPOS

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ESTIRPE DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae* MUTANTE NO GENE *glnE*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual De Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Marco Aurélio Schüler de Oliveira

Maringá

2021

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

C198c

Campos, Eduardo Lênnyn dos Santos

Construção e caracterização de uma estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* mutante no gene *glnE* / Eduardo Lênnyn dos Santos Campos. -- Maringá, PR, 2021.  
54 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio 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), 2021.

1. *Herbaspirillum seropedicae*. 2. Biologia molecular. 3. Fixação biológica de nitrogênio. 4. Glutamina sintetase. I. Oliveira, Marco Aurélio Schüler de , 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. 571.6

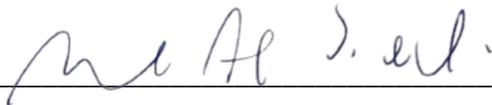
EDUARDO LÊNNYN DOS SANTOS CAMPOS

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ESTIRPE DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae* MUTANTE NO GENE *glnE*

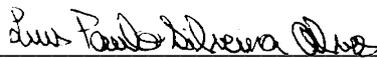
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual De Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 26/04/2021

**BANCA EXAMINADORA**



Marco Aurelio Schuler de Oliveira (Presidente)



Luís Paulo Silveira Alves



Edileusa Marques Gerhardt

## **BIOGRAFIA**

Eduardo Lênnyn dos Santos Campos nasceu em Corumbá/MS em 25 de maio de 1996. Se interessou no ensino médio pelos conteúdos complexos e desafiadores da bioquímica, conhecimentos que pareciam explicar tudo ao seu redor. Prestou o vestibular da Universidade Estadual de Maringá em 2014 para o curso de bacharel em bioquímica, iniciando a graduação em 2015. Se formou em 2018 e em 2019 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar vivo e terminado este trabalho mesmo em meio a uma pandemia, também por estar rodeado de pessoas maravilhosas, com tanto conhecimento e amor, possibilitando meu engrandecimento como pessoa e futuro pesquisador.

À minha família, minha mãe Cassia, ao meu pai Jocimar, segunda mãe Luciane e minhas irmãzinhas Erica e Elisa, por todo amor e apoio que me proporcionaram até hoje.

À minha família outra família que a vida me proporcionou, mom Elaine, vovó Tita. Minhas tias e tios: Antônia, Elisangela, Bety, Gracinha, Marlon, Reginaldo. Por tudo.

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes, dividindo os melhores e piores momentos.

Aos meus amigos, irmãos, camaradas de laboratório, Larissa, Eduardo, Ana, Lorena, Amanda, Barbara, Josy, que se mostraram mais que companheiros, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

À meu querido orientador Marco Aurélio, por me ajudar nessa pesquisa, esclarecer minhas dúvidas, me apoiar diariamente com muita paciência e compartilhar seu vasto conhecimento comigo.

À todos professores, técnicos e pós graduandos do departamento de Bioquímica, pela atenção e suporte fornecido.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, que ainda lutam pela sobrevivência da pesquisa no Brasil e me permitiram uma bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

## **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 *BBA – Protein and Proteomics* com modificações para facilitar o entendimento do texto e para obedecer aos critérios estabelecidos pelas resoluções vigentes do programa de pós-graduação.

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ESTIRPE DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae* MUTANTE NO GENE *glnE*

Campos ELS, Oliveira MAS

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

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP - adenosina difosfato
- AMP - adenosina monofosfato
- Amp - ampicilina
- ATP - adenosina trifosfato
- CTD - Citidina trifosfato
- DO - Densidade óptica
- DNA - ácido desoxiribonucleico
- EDTA - ácido etilenodiamino-tetra-acético
- GDH - glutamato desidrogenase
- GOGAT - glutamato sintase
- GS - glutamina sintetase
- Km - canamicina
- NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NAR - nitrato redutase respiratória
- NAS - nitrato redutase assimilatória
- NAP - nitrato Redutase dissimilatória periplasmática
- pb - pares de base nucleotídicas
- nm - nanômetro
- Pi - fosfato inorgânico
- PCR – reação da polímera em cadeia
- Sm - estreptomicina
- UMP – uridina monofosfato

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>14</b>
1.1 Importância da fixação biológica de nitrogênio .....	14
1.2. Assimilação do nitrogênio. ....	15
1.3. Glutamina sintetase .....	16
1.4. GlnE.....	17
1.5. Proteínas da família PII .....	17
1.6. Sistema Ntr .....	18
1.7. Utilização do nitrito e nitrato.....	20
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>23</b>
2.1. Meios de cultura e condições de cultivo .....	23
2.2. Bactérias e plasmídeos.....	24
2.3. Antibióticos.....	25
2.4. Preparo de células competentes utilizando MgCl <sub>2</sub> e CaCl <sub>2</sub> .....	25
2.5. Transformação bacteriana.....	26
2.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
2.7. Purificação de Plasmídeos em Pequena Escala .....	29
2.8. Eletroforese de DNA .....	29
2.9. Clonagem do fragmento de deleção.....	29
2.10. Conjugação bacteriana.....	30
2.11. Estratégia de mutagênese.....	31
2.13 Determinação da atividade da GS .....	33
2.14. Reação biossintética da GS .....	33
2.15. Reação de $\gamma$ -GT da GS .....	33
2.16. Atividade da Nitrogenase .....	34
<b>3. Resultados e discussões .....</b>	<b>35</b>
3.2 Caracterização da estirpe EL $\Delta$ glnE .....	39
3.2.1 Crescimento qualitativo em diferentes fontes de nitrogênio .....	39

3.2.2 Curvas de crescimento.....	41
3.2.3. Atividades da GS.....	43
<b>5. Referências .....</b>	<b>50</b>

## **RESUMO GERAL**

A assimilação de nitrogênio ambiental na biomassa bacteriana envolve a utilização de diversas vias metabólicas, e a escolha da via utilizada em um determinado momento permite a adaptação do metabolismo bacteriano para as condições encontradas. Assim, o fluxo metabólico através das vias de assimilação de nitrogênio é fortemente regulado, tanto para que a concentração intracelular das moléculas nitrogenadas seja mantida dentro de um intervalo fisiologicamente salutar, quanto para economia de energia. A principal fonte de nitrogênio da maior parte das bactérias é o amônio, o qual pode ser assimilado por duas vias metabólicas distintas: a via da glutamina sintetase (GS) e a via da glutamato desidrogenase (GDH). A via GS, alvo do presente trabalho, é fortemente regulada em resposta aos níveis de nitrogênio ambiental.

A enzima GS bacteriana possui 12 subunidades idênticas, separadas em dois anéis hexaméricos unidos “face-a-face”. Cada dodecâmero possui 12 sítios ativos entre os monômeros. Durante a sua atividade catalítica, a GS consome uma ligação de alta energia do ATP, exigindo um nível de controle refinado para evitar atividade desnecessária quando o amônio no meio é abundante, o que levaria a um desperdício de energia.

O modelo de regulação da enzima GS foi bem descrito principalmente em *Escherichia coli* e em *Rhodospirillum rubrum*. Nesses modelos mais bem estudados, a GS é regulada em dois níveis distintos. Uma forma de regulação ocorre por inibição alostérica em resposta a diversas moléculas, tais como alguns aminoácidos, glicosamina-6-fosfato, carbamil fosfato, CTP e AMP. Além disso, a GS dessas bactérias também é regulada por adenililação (adição de um AMP) reversível em um resíduo conservado de tirosina da enzima. A adenililação causa uma diminuição da atividade catalítica e uma maior sensibilidade de GS aos inibidores alostéricos, levando a uma diminuição do fluxo metabólico por essa via de assimilação de amônio. Cada uma das subunidades de GS pode ser adenililada, e a inibição da atividade é maior quanto maior for a quantidade de subunidades adenililadas. Essa modificação pós-traducional é adicionada em condições de altas concentrações de amônio, e removida quando as concentrações de amônio caem.

A flutuação entre os estados de GS modificada e não modificada permite que a célula se adapte a variações nas condições ambientais.

Tanto a adição do grupamento AMP ao resíduo conservado de tirosina quanto a sua remoção são catalisadas pela enzima bifuncional GlnE. GlnE possui uma arquitetura que remete à duas enzimas “fundidas”: A ATase, que adiciona grupamentos AMP à tirosina a partir do ATP, e a AR, que retira os grupamentos AMP por uma reação de fosforólise. A regulação recíproca das atividades ATase e AR permite uma regulação justa e eficiente do fluxo metabólico através de GlnE.

Dessa forma, a compreensão do metabolismo de assimilação de nitrogênio de uma bactéria exige um entendimento do mecanismo regulatório de GlnE. Em *E. coli* e *R. rubrum*, a regulação das atividades ATase e AR de GlnE é exercida pela proteína GlnB, pertencente à família de proteínas PII de transdução de sinal. No entanto, em *H. seropedicae* há evidências de trabalhos anteriores de que o modelo de regulação das atividades enzimáticas de GlnE pode ser substancialmente diferente daquele encontrado nos sistemas ortólogos citados. Para a melhor compreensão dessa regulação, nesse trabalho nós construímos uma estirpe de *H. seropedicae* com uma deleção em fase do gene *glnE* e iniciamos a caracterização do mesmo. A estirpe mutante foi denominada ELΔglnE.

Nos experimentos de caracterização da estirpe ELΔglnE de *H. seropedicae* nós encontramos fenótipos de crescimento da bactéria em determinadas fontes de nitrogênio. Quando nitrato foi adicionado como única fonte de nitrogênio, nenhum crescimento da estirpe mutante foi observado. Na presença de altas concentrações de amônio, a curva de crescimento da estirpe mutante apresentou uma fase lag mais longa do que a selvagem, no entanto, quando entrou em fase exponencial de crescimento, a taxa de crescimento e tempo de geração foram semelhantes à estirpe selvagem. Quando glutamato foi adicionado, por sua vez, como única fonte de nitrogênio, a curva de crescimento da estirpe mutante foi semelhante à da estirpe selvagem, indicando que o fenótipo de crescimento só é visualizado em condições de grande disponibilidade de nitrogênio.

Nós também verificamos a atividade da enzima GS das estirpes selvagem e mutante ELΔglnE em alto amônio e baixo glutamato. Os resultados mostraram que, como esperado, a atividade da enzima GS da estirpe selvagem foi regulada de acordo com a disponibilidade de nitrogênio, sendo maior na condição de baixo glutamato. No entanto,

na estirpe mutante EL $\Delta$ glnE, nenhuma alteração de atividade da enzima GS foi observada nas diferentes condições de nitrogênio testadas.

Também foi verificada a fixação de nitrogênio da estirpe mutante EL $\Delta$ glnE. As estirpes selvagem e mutante foram crescidas em meio semi-sólido e a atividade nitrogenase foi verificada pela capacidade de redução do acetileno a etileno. Os resultados indicaram que a fixação de nitrogênio não foi afetada pela deleção do gene *glnE*, pelo contrário, uma atividade de nitrogenase ligeiramente maior foi encontrada. As implicações dos fenótipos encontrados estão na discussão do trabalho.

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio capaz de colonizar os tecidos internos de gramíneas com grande interesse econômico e estimular o seu crescimento. A principal via de assimilação de amônio de *H. seropedicae* tem como primeiro passo a condensação do amônio a uma molécula de glutamato para formar glutamina, em uma reação catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS). A GS tem sua atividade pós-traducional regulada por uma adenililação reversível. Tanto a adição do grupamento adenilil, quanto sua remoção, são catalisados pela enzima bifuncional GlnE. Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da assimilação de amônio em *H. seropedicae* ainda não são conhecidos. Para contribuir com o conhecimento desses mecanismos, nesse trabalho nós construímos uma estirpe de *H. seropedicae* com uma deleção do gene *glnE* e iniciamos a caracterização da mesma. Os resultados mostraram que a estirpe mutante tem uma atividade de nitrogenase ligeiramente maior do que da estirpe selvagem. Além disso, a deleção causa um prejuízo no crescimento da bactéria quando nitrato é a única fonte de nitrogênio. Quando o amônio é a fonte de nitrogênio, a fase lag de crescimento da estirpe mutante é maior do que da estirpe selvagem. Os resultados permitiram aumentar o conhecimento sobre a regulação da assimilação de amônio em *H. seropedicae*.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*. Glutamina Sintetase. GlnE. Metabolismo de nitrogênio.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a nitrogen fixing bacterium capable to colonize the internal tissues of economical important grasses promoting their growth. The first step of the main ammonium assimilation pathway in *H. seropedicae* consists in the condensation of the ammonium to glutamate to form glutamine, in a reaction catalyzed by the glutamine synthetase enzyme (GS). The post-translational activity of GS is regulated by a reversible adenylylation. Both de addition and the removing of the AMP moiety are catalyzed by the bifunctional enzyme GlnE. The exact molecular mechanisms involved in the regulation of ammonium assimilation in *H. seropedicae* are not yet known. To contribute to this knowledge, we built a *H. seropedicae* strain carrying a deletion of the *glnE* gene, and began the mutant strain characterization. The results show that the mutant strain has a nitrogenase activity which is slightly higher than the wild-type. Furthermore, the deletion causes an impairing in bacterial growth when nitrate is the only nitrogen source. When ammonium is the nitrogen source, the lag phase of the growth curve of the mutant strain is higher than the wild type strain. Altogether, the results allow a better understanding about the regulation of ammonium assimilation in *H. seropedicae*.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*. Glutamine Synthesis. GlnE. Nitrogen metabolism.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Importância da fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um dos principais constituintes dos seres vivos, sendo que sua quantidade em massa é apenas menor que o carbono. Biopolímeros como ácidos nucleicos e proteínas possuem este elemento em suas cadeias, estando presente até mesmo em alguns carboidratos e lipídios. Dessa forma, o nitrogênio é um elemento essencial para todos os organismos. No entanto, o nitrogênio comumente é o nutriente limitante em diversos tipos de ambientes diferentes. E mesmo o ar atmosférico possuindo a maior parte da sua composição em dinitrogênio  $N_2$ , sua forma gasosa, esta forma é inerte para a maioria dos organismos. Esse fato justifica a enorme demanda por fertilizantes nitrogenados na indústria agrícola, apesar de extremamente oneroso e potencialmente deletério ao meio ambiente. Esse é um dos pontos chave da atual produção mundial de alimentos. Por isso, muitos estudos tentam alcançar alternativas verdes (Geng et al., 2019; Schulten & Schnitzer, 1997).

Uma alternativa para a fertilização nitrogenada é a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio nas culturas agrícolas. Os organismos capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico, tornando-o biodisponível, são denominados diazotrofos, todos organismos procarióticos. Quando associados com plantas, podem ser benéficos à agricultura, aumentando a produtividade e diminuindo impactos ambientais (Peoples et al., 1995). Neste contexto está inserida a espécie *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria gram-negativa, endofítica e epifítica facultativa, capaz de colonizar tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano ao hospedeiro (Baldani et al., 1986). Várias culturas economicamente importantes da família Poaceae são colonizadas, tais como milho (*Zea mays*), *Miscanthus*, arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorgo bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) e até mesmo outras culturas como banana (*Musa spp.*), abacaxi (*Ananas comosus*) (Monteiro et al., 2012). Por meio de ensaios de incorporação de  $^{15}N_2$ , se pode mostrar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio por espécies do gênero *Herbaspirillum*, sendo o nitrogênio fixado incorporado à biomassa da planta hospedeira (James et al., 1997; Pankievicz et al., 2015). Apesar dos avanços, os estudos com bactérias diazotróficas endofíticas de gramíneas, tais como *H. seropedicae*, não estão tão desenvolvidos como no caso de organismos simbioses que colonizam leguminosas, os

quais já constituem inoculantes comerciais aplicados na lavoura há mais de 100 anos (Santos et al., 2019).

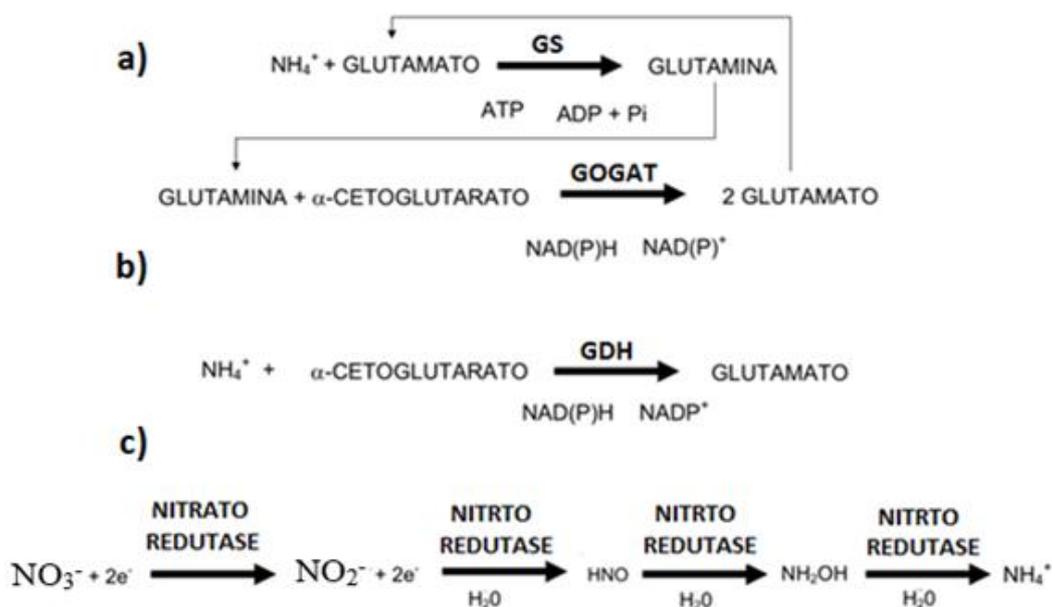
A fixação biológica do nitrogênio consiste no processo de catálise exercida pelo complexo enzimático da nitrogenase, que converte o nitrogênio atmosférico  $N_2$  em amônia  $NH_3$ . Este processo requer grande quantidade de energia obtida através do acoplamento da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP). Sendo assim, são reações onerosas para a célula o que culmina em uma necessidade de fina regulação, não só do processo de fixação como das vias de assimilação de nitrogênio, níveis energéticos, entre outros (Dixon & Kahn, 2004; Postgate, 1982).

## **1.2. Assimilação do nitrogênio.**

A incorporação do nitrogênio proveniente do ambiente na biomassa de um organismo é denominada assimilação do nitrogênio. Embora em bactérias a principal fonte de nitrogênio seja o íon amônio, outras fontes podem ser utilizadas, incluindo nitrito e nitrato. No caso do amônio, a porta de entrada é a condensação com o esqueleto carbônico do 2-OG (2-oxoglutarato ou  $\alpha$ -cetoglutarato), resultando nos aminoácidos glutamato e glutamina, os quais servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas do organismo. Como os níveis desses metabólitos precisam ser precisamente ajustados para o funcionamento do metabolismo celular e a assimilação de nitrogênio envolve gasto energético, essas vias são fortemente reguladas através de vários mecanismos genéticos e bioquímicos (Merrick & Edwards, 1995).

A principal via biossintética responsável por assimilar o amônio é conhecida como via GS/GOGAT. Ela consiste em uma via cíclica, na qual a enzima Glutamina Sintetase (GS) amina o glutamato à glutamina, que por sua vez tem seu grupo amida transferido para o 2-OG pela atividade da enzima glutamato sintase (GOGAT), produzindo duas moléculas de glutamato, uma das quais equivale ao substrato consumido na reação da GS (Figura 1a). Ainda existe a via GDH, cuja utilização é relacionada a condições de excesso amônio devido ao seu alto  $K_m$ , ou seja, altas velocidades da enzima só são alcançadas em altas concentrações de substrato. Nesta reação, o amônio e o  $\alpha$ -cetoglutarato são condensados a glutamato pela atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Figura 1b) (Hellings, 1998; Merrick & Edwards, 1995).

A assimilação de nitrogênio de nitrato e nitrito exige etapas enzimáticas adicionais. Primeiramente, são necessários transportadores específicos para a entrada dessas moléculas que possuem carga efetiva. Então, o nitrato é reduzido a nitrito pela enzima Nitrato redutase assimilatória. O nitrito então passa por diversas etapas de redução catalisada pela enzima Nitrito redutase assimilatória, até sua com versão final ao íon amônio (Figura 1c). Este íon agora pode através das vias GS/GOGAT ou GDH ser incorporado a um esqueleto carbônico de um aminoácido (Fernández et al., 2009).



**Figura 1.** Reações de assimilação de nitrogênio. a) Via GS/GOGAT b) via GDH c) Via Nitrato redutase assimilatória e Nitrito redutase assimilatória.

### 1.3. Glutamina sintetase

A primeira estrutura tridimensional de GS determinada, com 620 KDa, era de uma estirpe mutante de *Salmonella typhimurium* cuja GS não sofria adenililação. Após pouco tempo a estrutura tridimensional da GS de *Mycobacterium tuberculosis* também foi resolvida. Tanto a GS de *S. typhimurium* quanto de *M. tuberculosis* foram determinadas como sendo um dodecâmero formado de dois anéis hexaméricos unidos face a face, sendo assim 12 prôtmeros com sítios ativos formados entre esses monômeros (Eisenberg et al., 2000).

A GS pode ser regulada por mecanismos distintos, resultando em uma fina modulação de sua atividade, a qual é sensível a diversos sinais ambientais. Um desses

mecanismos é a regulação alostérica, a qual pode ser exercida por diversos metabólitos como aminoácidos (glutamina, histidina, triptofano), regulação a nível de substrato (glutamato e amônio) e estado energético pela razão ATP/ADP (van Heeswijk et al., 2013).

A GS ainda pode ser regulada por modificação pós-traducional. Em *E. coli*, *Rhodospirillum rubrum* e *Mycobacterium tuberculosis*, cada subunidade do dodecâmero pode sofrer a adição reversível de um AMP em um resíduo conservado de tirosina. Nestas bactérias, a adenililação causa uma redução da atividade de GS, e a deixa mais sensível à regulação exercida pelos moduladores alostéricos. A reação de adenililação e de desadenililação é catalisada pela enzima bifuncional GlnE (Eisenberg et al., 2000; van Heeswijk et al., 2013).

#### **1.4. GlnE**

A enzima GlnE possui as atividades catalíticas adenilil transferase (ATase) e adenilil removedora (AR), ambas exercidas sobre a GS. Sua estrutura tridimensional é desconhecida, mas se sabe que há um domínio central regulador, um N-terminal adenilil removedor e o C-terminal adenilil transferidor. O domínio central interage com as proteínas da família PII e dependente desta interação há incentivo de uma ou outra atividade (Clancy et al., 2007; Jaggi et al., 1997).

O estado de modificação de GS determina a sua atividade catalítica, dessa forma, o balanço entre as atividades ATase e AR permite aumentar ou diminuir a assimilação de amônio pela célula. Assim, GlnE integra sinais ambientais para ajustar finamente o metabolismo de nitrogênio da bactéria. A transdução dos sinais de nitrogênio para a enzima GlnE via proteínas da família PII envolve o sistema Ntr, que ainda será descrito na sequência (Huergo et al., 2013).

#### **1.5. Proteínas da família PII**

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).

Sua estrutura compreende  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas que formam um motivo estrutural em forma de barril conhecido como  $\beta\alpha\beta$  duplo. Esses motivos são conectados por uma volta longa, chamada de loop-T, que contém um resíduo Tirosina 51, alvo de uma modificação pós-traducional (uridililação). Ainda existem dois loops menores em cada monômero, loop-B que conecta a segunda  $\alpha$ -hélice à quarta folha  $\beta$ , e o loop-C que está na região C-terminal. Os loops B e T com um loop-C adjacente formam uma cavidade entre as subunidades que serve como sítio de ligação para efetores moleculares 2-OG, ATP e ADP (Carr et al., 1996; Radchenko & Merrick, 2011).

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). Em *H. seropedicae* já existem estudos que demonstram os efeitos da interação de PII dependente da modificação pós-traducional e efetores moleculares (Bonatto et al., 2012). *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 *nlnAglnKamtB* que é NtrC-dependente (Noindorf et al., 2011).

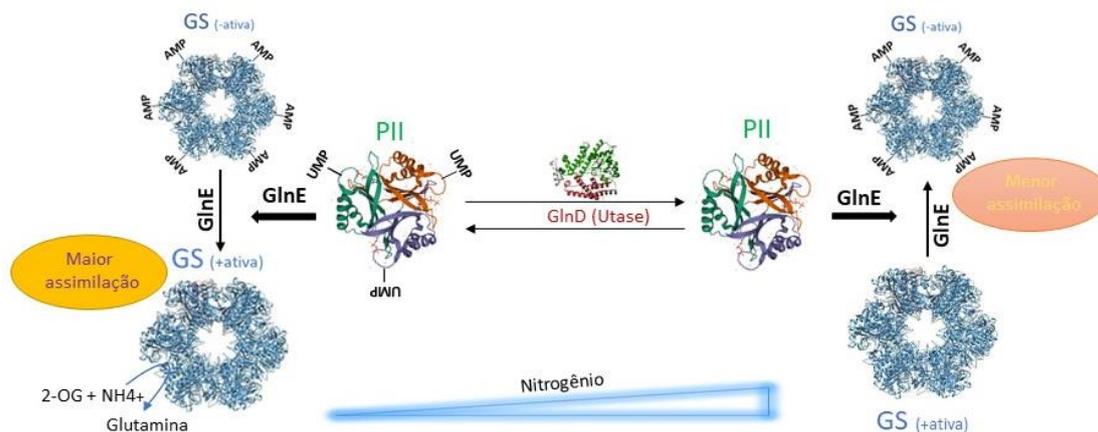
## 1.6. Sistema Ntr

O sistema Ntr compreende um conjunto de proteínas responsáveis por sensoriar os tipos e níveis de nitrogênio fixado ambiental, bem como modular o metabolismo em resposta a elas. Esse sistema permite que a bactéria adapte o metabolismo de acordo com a quantidade e qualidade das fontes disponíveis de nitrogênio no ambiente. Dentre as respostas do sistema Ntr, está a regulação da expressão de genes cujos produtos são necessários para a mobilização de fontes alternativas de nitrogênio, como nitrato e aminoácidos. Além da resposta transcricional, o sistema Ntr também modula a atividade de enzimas chave do metabolismo celular. Estas respostas dependem de sinais que refletem as condições intracelulares de nitrogênio e da transmissão destes sinais para outras proteínas. 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  $\sigma^{54}$  (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). A atividade de NtrB, por sua vez, é regulada pelas proteínas PII (Jiang et al., 1998). 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).

Quem catalisa as reações de uridililação e desuridililação sob as proteínas PII é a UTase também chamada de GlnD (Arcondéguy et al., 2001). Em *H. seropedicae* GlnD sensoria níveis de 2-OG, ATP e glutamina. Em baixas concentrações de glutamina e altas de 2-OG a atividade uridilil-removedora é inibida, e as PII são uridililadas como mostrado por Emori e colaboradores em 2018.

Além do sistema de dois componentes NtrB/NtrC, outro alvo importante das proteínas PII é a enzima GlnE. Em *E. coli* sabe-se que a interação entre GlnE e GlnB uridililada aumenta a atividade adenilil transferase (Jiang et al., 1998). Por fim a cascata acaba por inibir a atividade de GS que fica adenililada (Figura 2) (Kustu et al., 1989). O inverso também é verdadeiro: em altos níveis de glutamina e baixos de 2-OG, GlnD desuridilila PII e a interação PII /GlnE aumenta a atividade UR de GlnE (Jiang et al., 1998). GS desadenililada possui maior atividade. Essa cascata regula finamente o assimilação de nitrogênio (Huergo et al., 2013; Jiang & Ninfa, 2011).



**Figura 2.** Modelo de regulação de GS pelo sistema Ntr de proteobactérias de acordo com os diferentes níveis de concentração de nitrogênio intracelular. Em baixo de nitrogênio GlnD uridiliza PII, a qual interage com GlnE, favorecendo a desadenilação de GS. Em alto nível de nitrogênio, GlnD desuridiliza PII e esta, por sua vez, interage com GlnE favorecendo a reação de desadenilação de GS, aumentando atividade catalítica.

Dependendo da disponibilidade de nitrogênio no meio o organismo precisa se adaptar ao consumo de outras fontes como glutamato, arginina, leucina, nitrato, entre outros. A ativação da transcrição dos genes responsáveis pela mobilização dessas fontes de nitrogênio depende do sistema de dois componentes NtrB/NtrC, conforme descrito anteriormente (Commoner, 1977; Merrick & Edwards, 1995).

### 1.7. Utilização do nitrito e nitrato

O nitrato e nitrito em bactérias possuem dois papéis conhecidos: como aceptores de elétrons da cadeia respiratória anaeróbica ou como fonte de nitrogênio. A primeira depende da atividade da enzima Nitrato redutase respiratória (NAR), a qual utiliza o nitrato comoceptor de elétrons para a geração de energia. Alternativamente, o nitrato pode servir comoceptor de elétrons através da atividade da Nitrato Redutase dissimilatória Periplasmática (NAP), a qual em meio altamente redutor utiliza o nitrato como escoador de elétrons para fazer o balanço redox (Moreno-Vivián et al., 1999; Morozkina & Zvyagilskaya, 2007).

Quando o nitrato ou nitrito agem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas, a enzima Nitrato redutase assimilatória (NAS) atua em conjunto com a Nitrito redutase assimilatória permitindo que o nitrito e nitrato possam ser reduzidos a

amônio servindo como fonte de nitrogênio para o organismo (Moreno-Vivián et al., 1999; Morozkina & Zvyagilskaya, 2007).

Em *H. seropedicae* não há indícios da NAP, que utiliza o nitrato para fazer o balanço redox intracelular. Mas existe uma proteína com alta similaridade a Nitrato redutase respiratória (NAR), que está associada a síntese de ATP, utilizando o nitrato comoceptor final de elétrons (Bonato, Batista, et al., 2016). Contudo, o *H. seropedicae* não é capaz de crescer na ausência de oxigênio com nitrato como única fonte de nitrogênio. *H. seropedicae* possui ainda uma Nitrato redutase assimilatória e uma Nitrito redutase assimilatória (Baldani et al., 1986; Pedrosa et al., 2011).

Como a nitrito e nitrato são fontes alternativas, não preferenciais, a utilização dessas fontes ocorrerá apenas sob determinadas condições, sendo assim bem regulada. A regulação da assimilação de nitrito e nitrato ocorre principalmente em nível de expressão gênica. Não só das proteínas que catalisam as reações de assimilação como também pela expressão dos transportadores específicos (Noriega et al., 2010; Stewart & Bledsoe, 2003).

Em *H. seropedicae* a regulação da expressão dos genes do metabolismo de nitrato é realizada através de sistemas de dois componentes. Não só de NtrB/NtrC como já descrito (Persuhn et al., 2000), mas também há NtrY/NtrX que regulam a expressão de vários operons, inclusive *narKnirBDHsero\_2899nasA*, que contém o gene *nasA*, que codifica a NAS (Bonato et al., 2016). Também o sistema NarX/NarL que é responsável pela expressão de genes de NAR e NarK, um transportador de nitrato (Bonato et al., 2016).

Em *H. seropedicae* foi mostrado por RT-PCR que o nitrato induz a expressão de genes como *narU* e *narG* (genes para a assimilação de nitrogênio) em até 100 vezes (Guimarães, 2011). Além disso, os mutantes NtrC<sup>-</sup> e NtrY<sup>-</sup> são incapazes de crescer em meio com nitrato como única fonte de nitrogênio (Baldani et al., 1986). O modelo mais aceito é que os sistemas de dois componentes NtrB/NtrC, NarX/NarL e NtrY/NtrX sensoriam diversos metabólitos, e principalmente os níveis de nitrogênio intra celular, sendo, assim, responsáveis pela regulação do metabolismo do nitrato e nitrito (Bonato, Alves, et al., 2016; Persuhn et al., 2000).

## 1.8 Mutação do gene *glnE*

Estirpes mutantes com a deleção do gene *glnE* já foram obtidas nos organismos *Mycobacterium tuberculosis*, *Azotobacter vinelandii*, *Corynebacterium glutamicum* e *Rhodospirillum rubrum* (Carroll et al., 2008; Jonsson et al., 2009; Mus et al., 2017; Rehm et al., 2010). Em *A. vinelandii*, a deleção de *glnE* resulta em uma GS que é constitutivamente ativa, e faz com que a bactéria não seja capaz de crescer em meio com amônio (Mus et al., 2017). Em *R. rubrum*, no mutante com deleção de *glnE* a GS também não é modificada, no entanto a atividade de GS é menor do que na estirpe selvagem (Jonsson et al., 2009). Este resultado foi associado a uma menor expressão de GS na estirpe mutante somado a mutações espontâneas em GS, as quais foram selecionadas pela alta toxicidade de GS na ausência de GlnE. Uma conclusão semelhante foi encontrada em *M. tuberculosis*: a estirpe mutante com deleção com mutação no gene *glnE* só pode ser isolada na presença de L-metionina sulfoxamina, um inibidor da enzima GS (Carroll et al., 2008). Em *C. glutamicum*, a deleção de *glnE* causou um fenótipo pleiotrópico, com grandes perturbações metabólicas, inclusive com mudanças substanciais no padrão de expressão gênica (Rehm et al., 2010).

Devido à diversidade de fenótipos encontrados da deleção do gene *glnE* em diferentes espécies bacterianas, e a contribuição para o entendimento do metabolismo de nitrogênio que a análise desses fenótipos oferece, nós decidimos construir uma estirpe de *H. seropedicae* com deleção desse gene, e caracterizar os seus fenótipos. Como o mecanismo de regulação da atividade da enzima GS de *H. seropedicae* ainda carece de esclarecimento, esse trabalho pretende fornecer dados que contribuam para o melhor entendimento da via de assimilação de nitrogênio dessa bactéria.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Meios de cultura e condições de cultivo

Os meios de cultura utilizados para o cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram Luria-Bertani (LB) e Luria Bertani Agar (LA), a 37°C, sob agitação a 130 rpm (Sambrook et al., 1989). Sua composição está descrita na tabela 1.

**Tabela 1-** Composição do meio Luria-Bertani

Elemento	gramas/litro
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10
Triptona	10

Para o preparo do meio solido LA foi adicionado 15 g/L de ágar.

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato (Klassen et al., 1997). A metodologia inclui ainda mistura dos os meios NFb-malato e Luria-Bertani Agar para os experimentos de conjugação. A composição do meio NFb-malato é detalhada a tabela 2.

No momento do uso, era adicionada ao meio NFb-malato uma solução de fosfatos (159,4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 17,8 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). No momento do uso também foi adicionada uma fonte de nitrogênio, quando não especificado essa fonte era 20 mM de cloreto de amônio.

Para o preparo do NFb-malato sólido foi adicionado 15 g/L de ágar e para o semi-solido 1,5 g/L. O meio NFb-malato semi-sólido foi utilizado para estocagem das estirpes de *H. seropedicae* durante este trabalho.

**Tabela 2-** Composição do meio NFb-malato

Elemento	gramas/litro
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,0 . 10 <sup>-1</sup>
NaCl	1,0 . 10 <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	2,0 . 10 <sup>-2</sup>
Ácido nitrilo-triacético	5,6 . 10 <sup>-2</sup>
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,0 . 10 <sup>-2</sup>
Ácido málico	5,0 . 10 <sup>0</sup>
Biotina	1,0 . 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,0 . 10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2,35 . 10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 . 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	8,0 . 10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,4 . 10 <sup>-4</sup>

## 2.2. Bactérias e plasmídeos

Para este trabalho foram utilizados as bactérias e plasmídeos contidos nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3** - Lista de bactérias utilizadas neste trabalho.

Estirpe	Caraterística	Referência
<i>E. coli</i> S.17	Estirpe conjugadora, Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>	(Simon et al., 1983)
<i>E. coli</i> TOP 10	Estirpe de propagação de plasmídeos	Invitrogen
<i>H. seropedicae</i> SmRI	Estipe parental, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>	(Souza et al., 2000)
<i>H. seropedicae</i> <i>glnE</i> 1º evento	Estipe contendo pK18delglnE em seu genoma	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> ELΔglnE	Estipe sem o gene <i>glnE</i>	Este trabalho

**Tabela 4** – Plasmídeo utilizados neste trabalho.

Plasmídeos	Caraterística	Referência
pK18mocSacB	Resistência a Canamicina e gene de mobilização	(Schäfer et al., 1994)
pK18delglnE	Resistência a Canamicina, gene de mobilização e parte mutante e jusante do gene <i>glnE</i>	Este trabalho

### 2.3. Antibióticos

As soluções de antibióticos utilizadas foram preparadas conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Para preparo dos meios de culturas foram utilizados os antibióticos listados na tabela abaixo, de acordo com a metodologia de cada experimento.

**Tabela 5** – Antibióticos utilizados neste trabalho

Antibiótico	Concentração final
Ácido Nalidíxico	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Canamicina	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Estreptomicina	80 $\text{g.mL}^{-1}$

### 2.4. Preparo de células competentes utilizando $\text{MgCl}_2$ e $\text{CaCl}_2$

Para o preparo das células de *E. coli* TOP10 ou S17 competentes, uma cultura saturada que foi previamente crescida durante a noite em meio LB (37°C e 130 rpm), foi reinoculada em 50 mL de meio LB em um frasco do tipo erlenmeyer de 250 ml e cultivada a 37°C e 130 rpm por aproximadamente 3 horas até que a cultura de células atingisse uma  $\text{DO}_{600}$  entre 0,2 e 0,4. As células foram então transferidas para tubos de centrífuga, incubadas por 15 minutos em banho de gelo, coletadas por centrifugação 2.500 xg por 10 minutos, a 2°C e o sedimento de células ressuspenso em 15 mL de uma solução de  $\text{MgCl}_2$

(100 mM). Esta ressuspensão foi centrifugada 2.500 xg por 10 minutos, a 2°C, ressuspensa em 25 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) e então incubada por 30 minutos em banho de gelo. Após esta incubação, as células coletadas foram centrifugadas a 2.500 x g por 10 minutos e a 0°C, todo o sobrenadante descartado e finalmente as células ressuspensas em 200 µL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) preparada em glicerol 50%. As células ressuspensas foram aliqotadas em volume de 100 µL em microtubos previamente gelados. Seguindo a metodologia de (Morrison et al., 1994)

## 2.5. Transformação bacteriana

Para a transformação bacteriana, as células de *E. coli* tornadas competentes foram misturadas com 2 µL de DNA plasmidial (aproximadamente 100 ng) e a mistura mantida em gelo por 30 minutos. Após esse tempo, a mistura foi submetida a um choque térmico a 42°C por 45 segundos e então por 2 minutos em gelo novamente. Em seguida foram ressuspensas em meio LB e incubadas a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo 100 mg/mL do antibiótico respectivo ao plasmídeo.

## 2.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As condições para a reação de amplificação dos genes de estudo, em um volume final de 25 µL: 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 6) 10 pM. A reação foi realizada em 25 ciclos de desnaturação (96°C, por 15 segundos), anelamento em gradiente determinando a melhor temperatura e condição da PCR (60°C a 70°C por 20 segundos) e extensão (72°C, por 45 segundos). Após o final dos ciclos, 10 minutos de extensão a 72°C.

**Tabela 6-** Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que foram utilizados nas reações da PCR.

Nome	Sequência 5'- 3'
GlnE_fwd	CATCGACATATGGCCGCCGGTTTTCTTC
GlnE_rev	GTCAGGATCCTCAGCCAAAGACTTGCTGCCA
GlnEdelUP_fwd	CTCCAAGGATCCGATTCAAAGATTTCTGGC
GlnEdelUp_rev	TGATATTAGTCTAGAATGAGCAGGACGAGGCCTCGACGAG
GlnEdelDown_fwd	GCTCATTCTAGACTAATATCAGAATTCATGGTGCAATAC
GlnEdelDow_rev	GATTAGAAGCTTCCGAGCGCGAAGAAACG

O fragmento de deleção amplificado foi clonado no plasmídeo através da técnica de *primers* complementares (*overlapping*) (Ho et al., 1989). A região anterior ao início e posterior ao final do gene a ser deletado são amplificadas então em dois fragmentos, sendo o fragmento à montante chamado de *Up*, e o outro à jusante chamado de *Down*. Os *primers* são desenhados para que a porção 3' do fragmento *Up* seja complementar à sequência 5' do fragmento *Down*. Uma segunda amplificação usa essa região complementar interna do gene como molde juntamente com os *primers* flanqueadores externos, gerando um único fragmento sem a região interna do gene, chamado de fragmento de deleção, como mostrado na figura 3. As sequências franqueadoras do fragmento de deleção amplificado, adicionada nos *primers*, continham sítios de reconhecimento as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI* para direcionar a clonagem no plasmídeo pK18mobsacB.

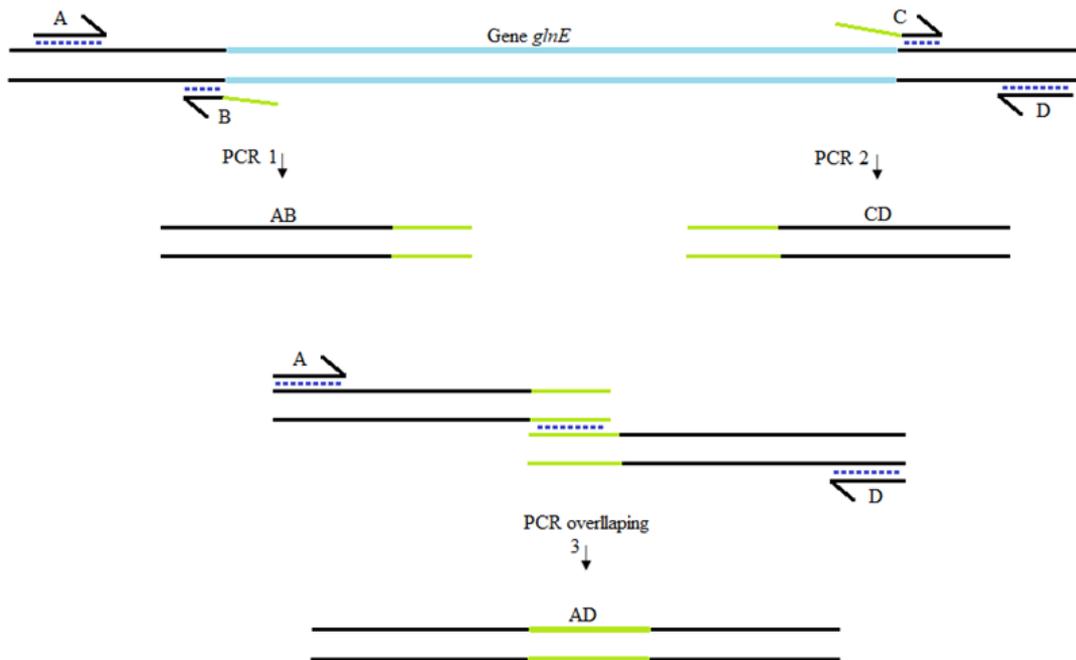
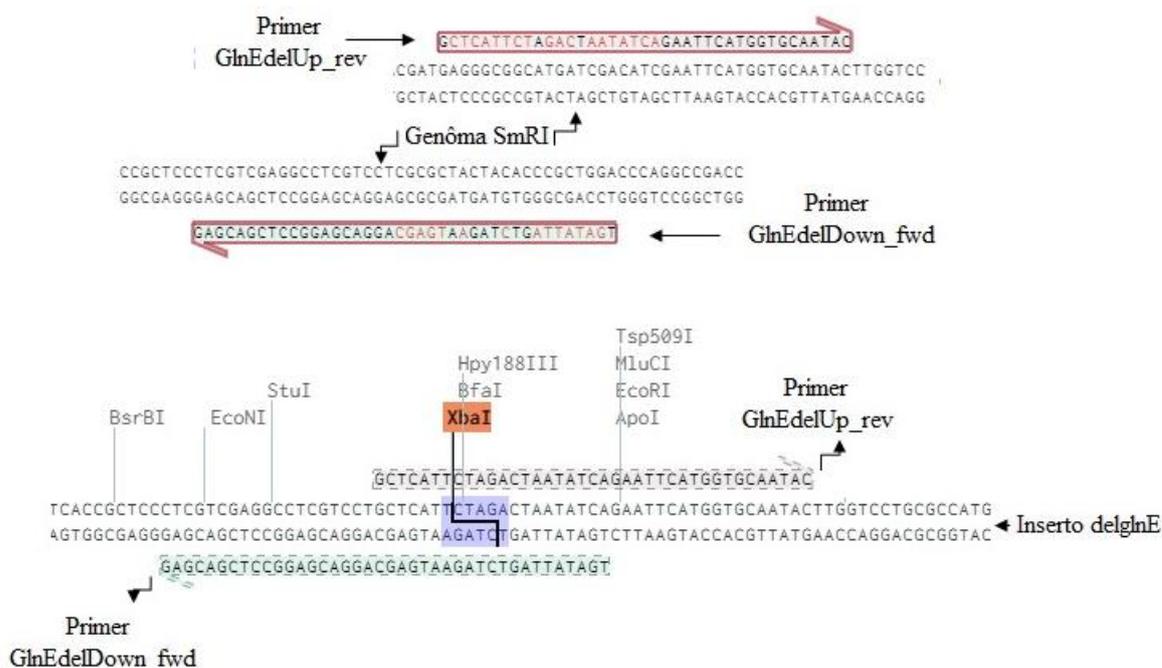


Figura 3. Estratégia utilizada nas reações de PCR para a síntese de um segmento que contenha apenas a região a montante e a jusante do gene *glnE*. A, B, C e D representam o primers, AB representa o fragmento Up gerado na PCR 1. CD representa o fragmento *Down* gerado na PCR 2. AD representam o fragmento de deleção final, gerado na PCR *overlapping*.

Na sequência complementar entre os fragmentos *Up* e *Down* foi adicionado, ainda, um sítio de reconhecimento da enzima de restrição *XbaI* (Figura 4). Isso possibilita uma posterior distinção dos fragmentos através do tratamento com esta enzima.



**Figura 4.** Anelamento dos *primers* internos GlnEdelUp\_rev e GlnEdelDown\_fwd com o DNA genômico do *H. seropedicae* (SmRI) e com o fragmento delglnE. *Mismatch* da sequência sendo mostrada em vermelho nos *primers*. Sítio *XbaI* sendo formado pela estratégia de amplificação. Imagem gerada a partir do <https://benchling.com>.

## 2.7. Purificação de Plasmídeos em Pequena Escala

O isolamento e purificação do DNA plasmidial foi realizado seguindo o método de lise alcalina descrito por (Sambrook et al., 1989).

## 2.8. Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose 1% (m/v), segundo descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

## 2.9. Clonagem do fragmento de deleção

Para a clonagem do fragmento de deleção foi utilizado o vetor pK18mobsacB. Para a digestão foram utilizadas as enzimas de restrição: *BamHI*, e *HindIII*, seguindo as condições de reação sugeridas pelos fabricantes. Foram digeridos tanto o vetor pK18mobsacB quanto o produto amplificado de deleção. Após essa digestão, as enzimas de restrição foram inativadas a 80°C por 20 minutos. O DNA foi então purificado, e as

reações de ligação foram realizadas seguindo orientações do fabricante da T4 DNA ligase. A ligação foi transformada em *E. coli* estirpe Top10, que foi plaqueada em meio LA contendo o antibiótico canamicina. As colônias transformantes foram inoculadas em meio líquido LB, tiveram o seu DNA plasmidial extraído e analisado por restrição usando as enzimas *Bam*HI, *Hind*III e *Xba*I para confirmação da clonagem. O clone confirmado foi denominado pK18delglnE.

## 2.10. Conjugação bacteriana

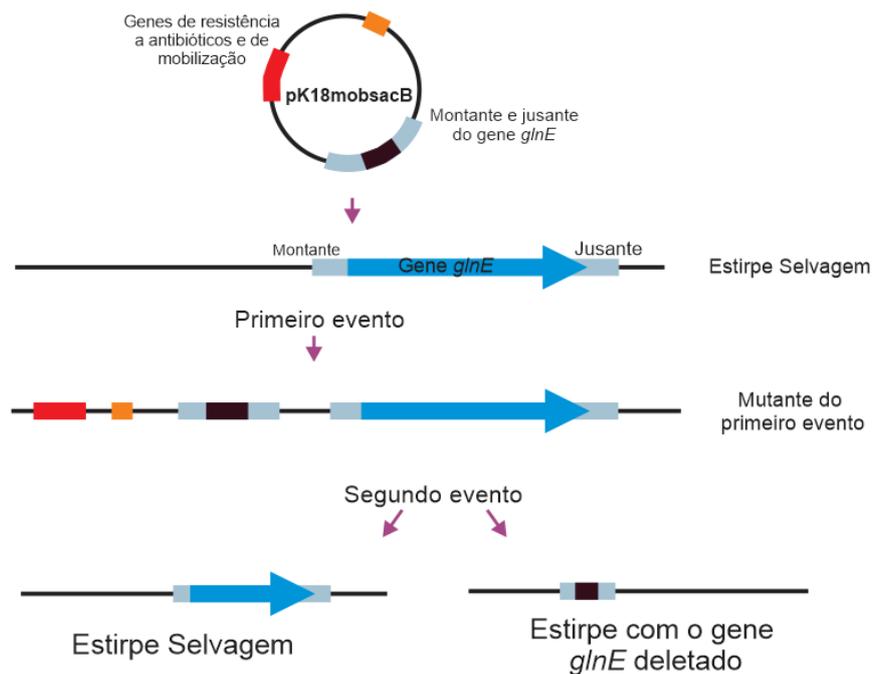
A conjugação do plasmídeo para *H. seropedicae* foi feita seguindo o protocolo de (Batista, 2011). Sucintamente, o plasmídeo resultante do processo da clonagem descrita no item 2.9 foi primeiramente transformado na *E. coli* estirpe S17 competente (doadora). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora SmR1) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas um dia antes da conjugação nos meios NFbHPN-Malato e LB, suplementado com os antibióticos para a seleção. No dia da conjugação, as culturas saturadas foram utilizadas para o re-inóculo nos meios de cultura adequados sem adição de antibióticos. Um volume de 50 µL das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) então inoculadas em 3,0 mL de NFbHPN-malato 3 horas antes do inóculo de 25 µL da estirpe S17 de *E. coli* (doadora) em 3 mL de meio LB. Os tempos de incubação, no dia da conjugação, das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram de, respectivamente, 6 e 3 horas nas condições ótimas de crescimento.

Para a conjugação, foi realizada uma combinação da cultura de *H. seropedicae* com cultura de *E. coli* em duas proporções distintas. Em um microtubo foi adicionado 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli*, e em outro 100 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 µL da cultura de *E. coli*. As suspensões de células de ambas misturas foram colocadas em porções distintas na placa, como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30°C por 24 horas. A massa total de célula foi coletada e ressuspensa em 1 mL de NFb-malato, então diluídos 1:10 1:100 1:1000. A partir de cada diluição retirado 250 µL que foram plaqueados em meio NFbLP-malato sólido contendo 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e os antibióticos adequados.

### 2.11. Estratégia de mutagênese

Para a construção de uma estirpe de *H. seropedicae* com deleção do gene *glnE*, foi utilizada uma estratégia que consiste na substituição do gene selvagem pela versão homóloga contendo deleção na região codificadora do gene através de um processo de dupla recombinação homóloga.

A estratégia é dividida em dois eventos. Para o primeiro evento, o plasmídeo pK18delglnE em S17 foi transferido por conjugação para de *H. seropedicae*. Esse vetor é chamado suicida, pois não se replica em *H. seropedicae*. Como ele tem um marcador de seleção positiva, um gene de resistência ao antibiótico canamicina, e o plasmídeo não é estável nessa bactéria, é possível isolar colônias que sofreram recombinação nas quais o plasmídeo inteiro foi inserido no genoma pelo processo de recombinação simples. Essa estirpe que sofreu o primeiro evento de recombinação possuía uma cópia do gene selvagem e a cópia deletada, e foi denominada *H. seropedicae glnE* 1º evento. Essa estirpe após duas gerações foi então submetida a um segundo evento de recombinação homóloga, que levou à perda do plasmídeo e de uma das cópias de *glnE*, a selvagem ou a deletada. A seleção de estirpes que sofreram esse segundo evento foi possível pela presença de um marcador negativo: o gene *sacB*, presente no plasmídeo, que confere toxicidade na presença de sacarose. Para isso, a estirpe isolada no primeiro evento é plaqueada em meio contendo sacarose 5%. Como existe, teoricamente, iguais chances de saída do gene selvagem ou do deletado, a última etapa consiste na verificação da deleção do gene *glnE*, através de reações de PCR, do DNA das colônias que crescem em sacarose. Deste modo obtivemos uma estirpe de *H. seropedicae*, que possui no seu genoma apenas a região a montante e jusante do gene *glnE*, não expressando a proteína GlnE, como mostrado no esquema geral da figura 5. Essa estirpe foi chamada de ELΔglnE.



**Figura 5.** Estratégia para deleção por recombinação, dividida em dois eventos, sendo o primeiro a entrada inteira de um vetor suicida por recombinação homóloga, e um segundo evento onde ocorre a excisão de um segmento dos lócus, selecionado pelo marcador negativo.

## 2.12 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita através do método colorimétrico de Bradford. Esse método é baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com proteínas (Bradford, 1976). O sistema de reação continha um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , sendo 170  $\mu\text{L}$  da solução do corante (solução Bradford – 10 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-205, 95% etanol e 85% ácido fosfórico) e 30  $\mu\text{L}$  da amostra, a qual foi diluída quando necessário. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm determinada com o auxílio do equipamento Flex Station 3 (Molecular Devices). A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovina como padrão, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. O limite de sensibilidade do método é de 1 a 10  $\mu\text{g}$  de proteína.

### 2.13 Determinação da atividade da GS

A determinação da atividade da enzima glutamina sintetase utilizando o método proposto por (Bender et al., 1977) com algumas modificações.

Os extratos proteicos para o experimento foram obtidos de 3 ml de meio NFb-malato inoculados com suas respectivas estirpes, após crescimento de 24 horas a 30°C e agitação de 120 rpm. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas e resuspensas em 400 µl KCl 1%, e então lisadas por sonicação. As proteínas totais foram dosadas através do método de Bradford conforme descrição no item 2.12. Em todas as atividades foi adicionado 5 µg de proteínas totais de seus respectivos extratos.

Para a realização da atividade biossintética e da atividade  $\gamma$ -GT foi utilizado 40 µl do mix reacional, 20 µl de extrato proteico mais água, dependendo da concentração de proteínas totais necessária para se alcança 5 µg de proteínas, e 10 µl do reagente que dispara a reação como descrito nas seções referentes a cada experimento. Em um volume final de 70 µl de reação.

### 2.14. Reação biossintética da GS

A reação biossintética de GS foi realizada em banho maria à 37°C em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados: imidazol 57 nM, hidroxilamina 28 nM, MgCl<sub>2</sub> 34,2 nM e Glutamato 97,14 nM. Para um volume final de 70 µL.

A GS foi adicionada de acordo com as concentrações indicadas nos experimentos. As reações foram disparadas pela adição de 10 µL de ATP 100 mM (concentração final de 14 mM) e incubada em banho maria a 37°C por mais 60 minutos.

A reação foi parada com a adição de um Stop Mix, composto por FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,04M), TCA (0,12 M) e HCl (0,61 M). A quantificação da reação foi feita com a leitura da absorbância a 540 nm do produto.

### 2.15. Reação de $\gamma$ -GT da GS

Essa reação foi realizada em banho maria à 37°C em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados: Imidazol 77,14 mM, hidroxilamina 11,4 mM, MnCl<sub>2</sub> 0,17 mM, arseniato de potássio 14,3 mM e ADP 0,23 mM. Para um volume final de 70 µL.

As reações foram pré-incubadas 5 minutos a 37°C. Após esse tempo, a reação foi disparada pela adição de 10 µL de glutamina 100 mM (concentração final de 14 mM) e incubada em banho maria a 37°C por mais 60 minutos.

O término da reação e quantificação do produto foram feitos da mesma forma como descrito para a reação biossintética.

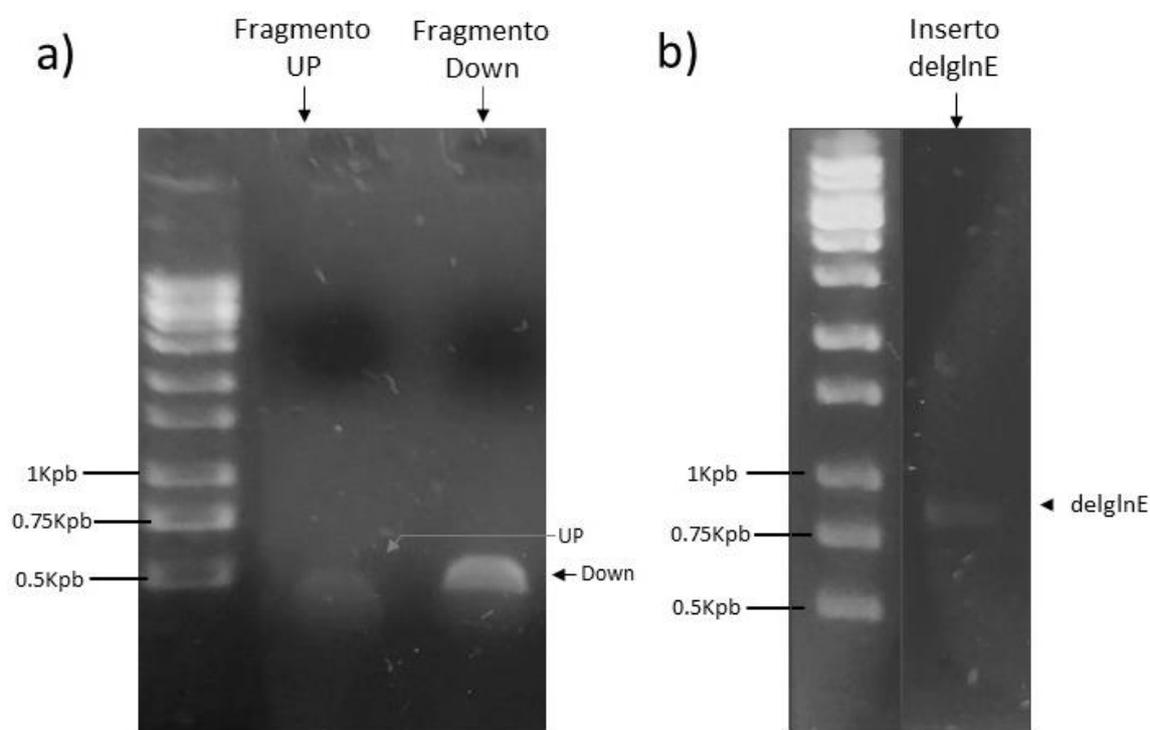
## **2.16. Atividade da Nitrogenase**

A atividade da nitrogenase foi determinada através do método de redução do acetileno (F. de O. Pedrosa & Yates, 1984). A estirpe mutante foi crescida em meio malato semi-sólido. Quando houve a formação de uma massa celular junto a superfície, os frascos foram fechados e injetados neles 10% da sua fase gasosa em acetileno. Então as culturas foram incubadas por 1 hora a 30°C e alíquotas de 0,5 mL da fase gasosa foram coletadas e analisadas por cromatografia gasosa (Varian 2440D), equipado com coluna Poropak N e detector de ionizador de chama; o gás de arraste foi nitrogênio super seco, e como padrão foi utilizado Etileno padrão 100ppm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Construção da estirpe mutante.

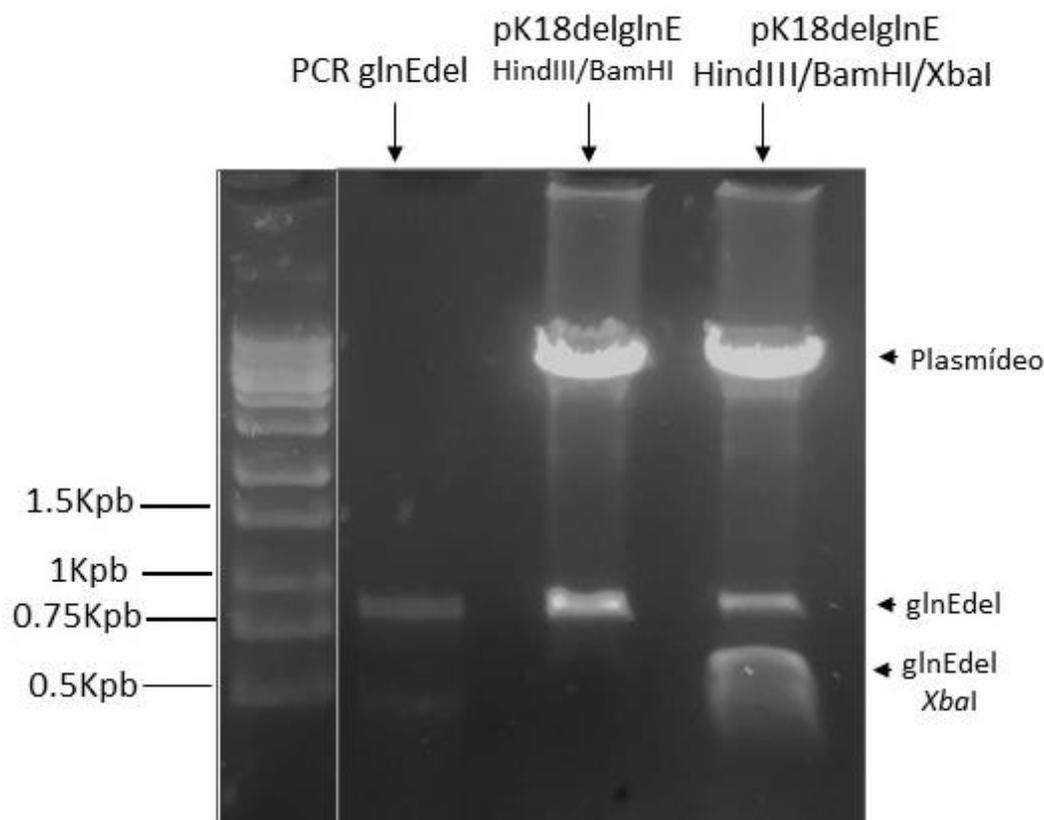
Para a execução da estratégia mutagênica anteriormente já descrita, foram realizadas múltiplas reações de PCR com seus respectivos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Como molde foi usado o DNA genômico dos *H. seropedicae* selvagem (SmRI). As primeiras duas reações resultaram na amplificação dos fragmentos *Up* de 365 pb e do fragmento *Down* de 464 pb como mostrado na figura 6a. Estes produtos, em conjunto, permitiram a realização da reação de PCR *overlapping*, que os utilizou como molde, resultando no inserto delInE de 808 pb (figura 6b).



**Figura 6** – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X). a) sendo os fragmentos *Up* 464 pb e *Down* 365 pb. b) sendo PCR resultando o inserto delInE de 808 pb.

O vetor pK18mobsacB foi propagado em *E. coli* TOP 10. Este e o inserto foram então digeridos com as enzimas *HindIII* e *BamHI*, já que sítios de restrição para essas enzimas estavam presentes tanto no vetor quanto no inserto. Após ligação e transformação, foram obtidos clones. A confirmação da clonagem do inserto no plasmídeo foi feita utilizando-se enzimas de restrição *BamHI*, *HindIII* e *XbaI*. A digestão

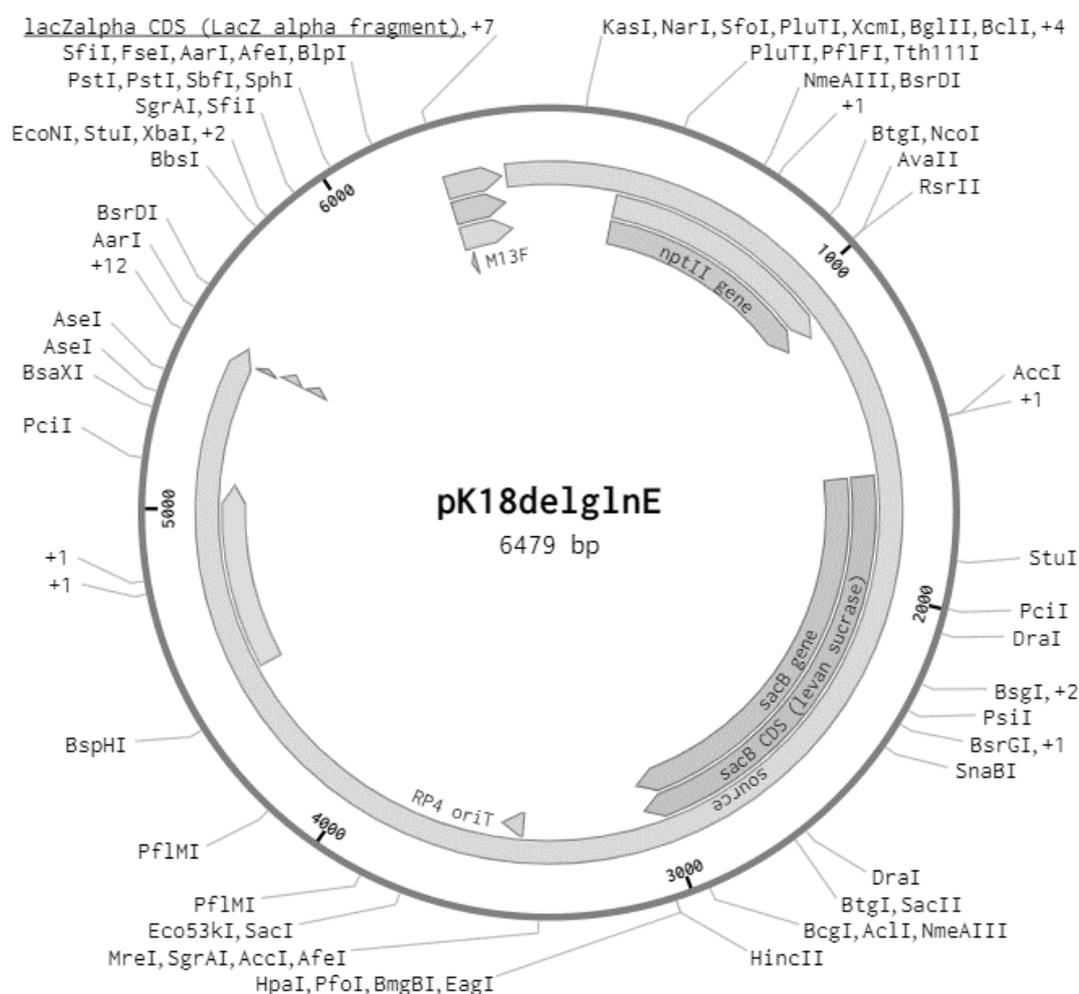
do plasmídeo que chamamos de pK18delglnE (Figura 7) resultou em fragmentos 808 pb com a restrição *HindIII/BamHI* e de aproximadamente 350 e 450 pb para a restrição *HindIII/BamHI/XbaI*, confirmando a clonagem.



**Figura 7.** Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X. Confirmação da clonagem do plasmídeo pK18delglnE. O primeiro poço contém o marcador de pares de base, seguido pela PCR do delglnE, restrição do clone com as enzimas *HindIII* e *BamHI*, e restrição do clone com as enzimas *HindIII*, *BamHI* e *XbaI*. As setas indicam as posições dos fragmentos de 350, 450 e 808 pb.

Após a confirmação do vetor pK18delglnE (figura 8), o mesmo foi transformado na estirpe S17 de *E. coli*, e conjugado com a estirpe selvagem de *H. seropedicae* conforme descrito na metodologia, item 2.10. Este processo permitiu o isolamento de estirpes transconjugantes de *H. seropedicae* com o vetor suicida inserido no interior do seu genoma, selecionadas pela resistência ao antibiótico canamicina. Essa estirpe foi confirmada por PCR, utilizando o conjunto de *primers* que amplificam o gene *glnE*. Como o inserto clonado no plasmídeo pK18delglnE possui a região jusante e montante do gene, o fragmento de deleção é amplificado, assim como o gene selvagem do genoma.

Dessa forma, o resultado da amplificação do recombinante de primeiro evento deveria conter o gene *glnE* com 2786 pb e o fragmento de deleção com 808 pb ao mesmo tempo. O resultado dessa PCR está mostrado na figura 9.

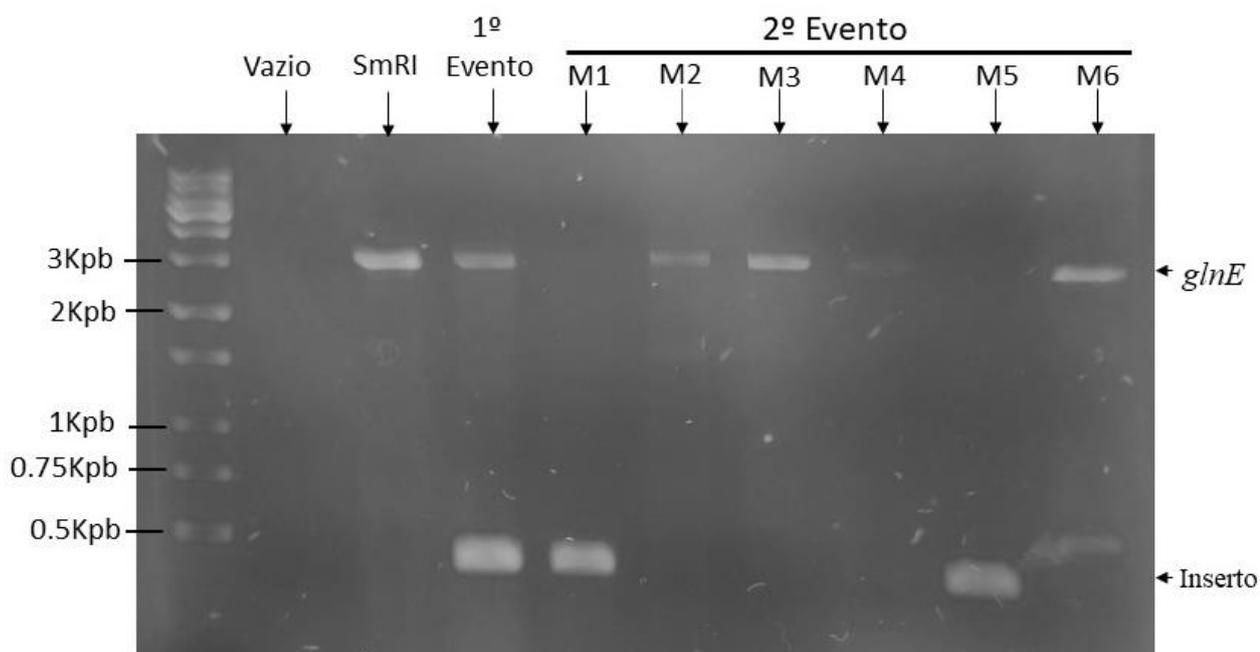


**Figura 8.** Plasmídeo pK18mobSacB inserido o inserto delglnE, chamado de pK18delglnE. Contendo resistência a Canamicina, gene de mobilização e região montante e jusante do gene *glnE* de *H. seropedicae*. Figura gerada a partir de <https://benchling.com>

A estirpe de *H. seropedicae* recombinante de primeiro evento foi utilizada para o segundo evento de recombinação, dessa vez uma recombinação interna. Para isso, uma cultura da estirpe recombinante de primeiro evento foi inicialmente replicada por duas gerações, e então plaqueada em meio Nfb malato sólido contendo sacarose 5% e amônio 20 mM. A sacarose foi usada como um meio de seleção negativa, já que é tóxica para estirpes que possuíssem o gene *sacB*, ou seja, permitiria a seleção apenas de bactérias que

tivessem passado por um processo de recombinação interna que eliminasse o gene *sacB*. Quando ocorre essa mobilização de segundo evento de recombinação, existe a possibilidade de excisão do gene *glnE* selvagem ou da versão com a deleção, teoricamente com iguais chances. A estirpe de interesse são as com o gene *glnE* deletado. As primeiras tentativas foram sem sucesso, todas as colônias isoladas possuíam a versão selvagem do gene, e nunca a mutante, indicando que a mutação poderia ser tóxica naquelas condições. Partindo da hipótese que a alta concentração de amônio do meio poderia conferir toxicidade para a deleção de *glnE*, nós repetimos o processo de isolamento de recombinante alterando a fonte de nitrogênio da cultura para 10 mM de glutamato, já que se espera que o mutante final tenha dificuldade no crescimento em alto nitrogênio (Mus et al., 2017). As estirpes recombinantes obtidas nesse processo foram crescidas e submetidas à confirmação da mutação.

A confirmação da estirpe foi realizada por PCR com os primers que amplificam o gene *glnE* e o resultado está mostrado na figura 9. Nas linhas M1 e M5 dessa figura, foi amplificada apenas a versão deletada do gene *glnE*, indicando o sucesso na obtenção da estirpe desejada. Nota-se que os outros mutantes de segundo evento perderam o a banda deletada (438 pb), mantendo a versão selvagem.



**Figura 9** – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X. Confirmação das estirpes de *H. seropedicae* do segundo evento de recombinação. PCR com *primers* GlnE\_fwd e GlnE\_rev, com temperatura de anelamento de 62°C. Poços: marcador de pares de base, controle vazio, estirpe selvagem SmRI com banda *glnE* (2786 pb), mutante de primeiro evento contendo ambas as bandas *glnE* (2786 pb) e inserto (438 pb) e mutantes de segundo evento respectivamente. Os mutantes de segundo evento M1 e M5 são os mutantes de interesse contendo apenas a banda do inserto (438 pb) e não a banda *glnE* (2786 pb). M2, M3, M4 e M6 perderam a banda do inserto plasmidial (438 pb).

## 3.2 Caracterização da estirpe ELΔ*glnE*

### 3.2.1 Crescimento qualitativo em diferentes fontes de nitrogênio

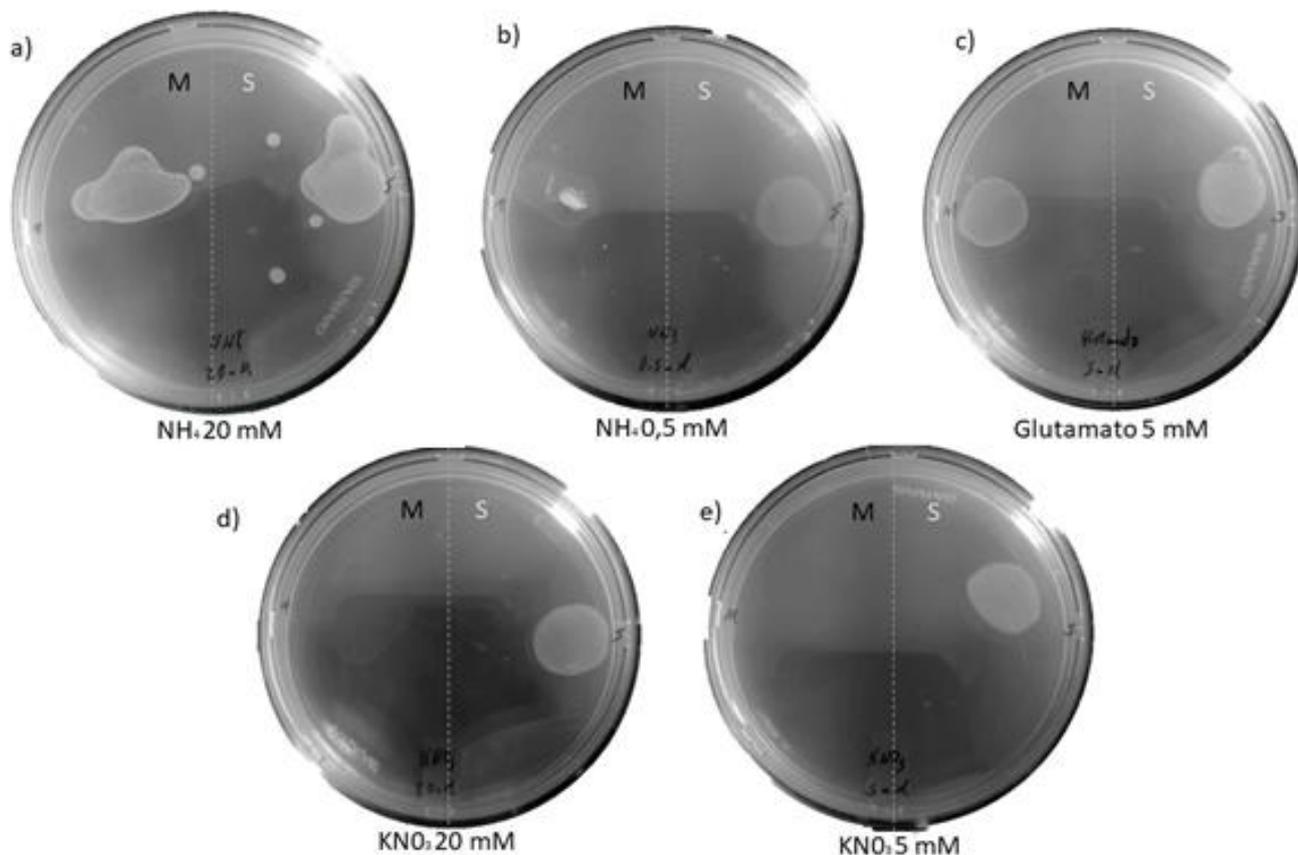
Uma vez a estirpe de *H. seropedicae* sem o gene *glnE* foi obtida, pôde-se caracterizá-la fenotipicamente. Chamamos o mutante M1 de ELΔ*glnE*. Para as caracterizações fenotípicas, realizamos primeiramente um teste qualitativo visual, comparando as estirpes mutante e selvagem quanto ao crescimento em placas de meio Nfb malato sólido em diferentes fontes de nitrogênio. Para isso, diluiu-se a cultura das estirpes 1:10 no meio Nfb malato líquido, então uma gota de 80 µl de cada cultura foi plaqueada em lados opostos de uma Placa de Petri contendo meio sólido com as seguintes fontes únicas de nitrogênio: NH<sub>4</sub>Cl 20 mM, NH<sub>4</sub>Cl 0,5 mM, KNO<sub>3</sub> 20 mM, KNO<sub>3</sub> 5 mM e de glutamato 5 mM. O resultado está mostrado da figura 10.

Nas placas com glutamato 5 mM e de amônio 20 mM as colônias formadas das estirpes mutante e selvagem foram semelhantes (Figura 10. a, c). Isso é esperado no caso

do glutamato como fonte, já que não depende diretamente da atividade de GS para a assimilação da molécula nitrogenada. Contudo, em um meio com alto amônio se esperaria que a provável desregulação causada pela ausência de GlnE pudesse afetar o crescimento. No entanto, nenhuma diferença qualitativa foi observada nesse experimento.

Nas placas com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio quase não houve crescimento da estirpe mutante (Figura 10. d, e), pode-se notar apenas um leve crescimento no meio com 20mM de nitrato, indicando que o metabolismo de nitrato foi afetado pela mutação do gene *glnE*.

Na placa com 0,5 mM de amônio o mutante teve baixo crescimento em comparação ao selvagem (Figura 10. b), resultado que vai ao contrário do esperado, já que na ausência de GlnE, se espera uma GS mais ativa sem adenililação, logo assimilando mais facilmente o amônio. Para explicar o fenótipo de baixo crescimento do mutante ELΔ*glnE* em baixas concentrações de amônio, duas hipóteses podem ser formuladas: (1) a enzima GS poderia estar sendo adenililada, ao menos parcialmente, na estirpe selvagem em baixo amônio, de modo diverso ao esperado. O modelo proposto para *E. coli*, o mais conhecido, propõe que em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a GS permanece na forma não modificada, para aumentar a eficiência na assimilação de amônio (Jiang & Ninfa, 2011). Nesta hipótese, a GS de *H. seropedicae* possivelmente seria mais sensível aos níveis de nitrogênio fixado do que em *E. coli* e, mesmo baixas concentrações de amônio desencadeariam a modificação de GS, provavelmente para estabilizar a concentração de glutamina e glutamato, ou mesmo para poupar ATP. (2) Alternativamente, o não crescimento em baixo amônio também poderia ser consequência indireta da ausência de GlnE pela diminuição da atividade de NtrC. Em condições de baixo amônio, a expressão de GS é dependente de NtrC (Schwab et al., 2007). Se, por algum motivo, a ausência de GlnE causa indiretamente uma diminuição na atividade de NtrC, a expressão de GS pode estar bastante diminuída nessa condição, levando a um baixo crescimento. Essas duas hipóteses serão testadas no futuro com novos experimentos.



**Figura 10.** Crescimento qualitativo do mutante EL $\Delta$ glnE (M) em comparação com o selvagem SmRI (S) em placa de petri em diferentes condições de nitrogênio. a) 20mM de Cloreto de amônio b) 0,5 Mm de cloreto de amônio c) 5 mM de glutamato d) 20 mM de KNO<sub>3</sub> e) 5 mM de KNO<sub>3</sub>.

### 3.2.2 Curvas de crescimento

Para fazer uma caracterização mais precisa do fenótipo de crescimento da estirpe mutante na presença de diferentes fontes de nitrogênio, nós acompanhamos o perfil de crescimento em meio líquido em três condições diferentes de nitrogênio, construindo as curvas mostradas na figura 11. Os parâmetros cinéticos de crescimento também se encontram nesta figura. As condições utilizadas foram 20 mM de cloreto de amônio, 5 mM de glutamato e 5 mM de nitrato de potássio. As condições refletem baixo amônio (5 mM glutamato) e alto nitrogênio (20 mM NH<sub>4</sub>Cl) além da fonte alternativa (5 mM KNO<sub>3</sub>). Nota-se que a estirpe mutante não cresceu em meio com nitrato como única fonte de nitrogênio.

No meio com alto amônio, o mutante EL $\Delta$ glnE teve sua fase lag estendida, em comparação com o selvagem, já que foram mais de três horas para que atingisse o crescimento exponencial em comparação ao selvagem. Embora a fase exponencial tenha

começado com algum atraso, os parâmetros cinéticos e a inclinação das curvas indicam que o crescimento da estirpe mutante na fase logarítmica é semelhante a selvagem. Esse resultado explica porque nenhuma diferença qualitativa foi observada no experimento da figura 10a. A fase lag estendida do mutante em alto amônio pode indicar uma toxicidade inicial dessa fonte de nitrogênio, já que a reação da GS consome ATP, podendo gerar um desbalanço na razão ATP/ADP e interferindo no nível de crescimento da cultura. Só após esse alto amônio ser de metabolizado, se encontrando em outras moléculas nitrogenadas, a cultura deve conseguir alcançar a fase de crescimento exponencial.

A estirpe mutante no meio nitrato mesmo no final do experimento não atingiu 20% do crescimento da selvagem, resultando em baixa taxa de crescimento e alto tempo de geração. O pré-inóculo utilizado continha glutamato como fonte, o que pode significar que o crescimento aconteceu até o esgotamento dessa fonte proveniente do pré-inóculo. Esse dado indica grande deficiência na assimilação do nitrato na cultura da estirpe mutante, indicando que a assimilação de nitrato da estirpe selvagem deve depender da adenililação de GS. Pelo nosso conhecimento, essa parece ser a primeira evidência de que a assimilação de nitrato parece ser dependente do estado de modificação pós-traducional de GS. A expressão dos genes que codificam as enzimas que fazem assimilação do nitrato são dependentes do ativador NtrC, sendo expressas principalmente na ausência de outras fontes de nitrogênio, e na presença de nitrato (Moreno-Vivián et al., 1999). Portanto, a curva de crescimento com nitrato corrobora a hipótese de baixa atividade de NtrC no mutante EL $\Delta$ glnE. Desta forma proteínas essenciais para a assimilação do nitrato não seriam expressas. De fato, em *C. glutamicum* a deleção de GlnE também resultou em fenótipos transcricionais, no entanto naquela bactéria os níveis de genes cuja expressão é dependente de NtrC parecem aumentadas, diferente da hipótese que sugerimos para *H. seropedicae* aqui (Rehm et al., 2010).

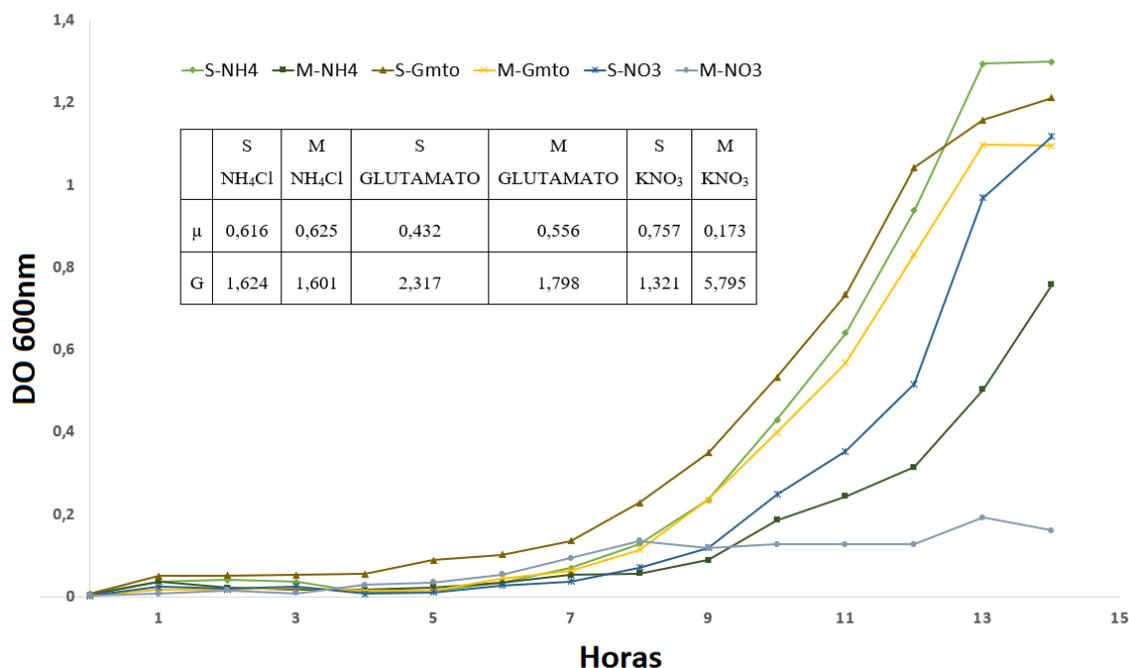


Figura 11. Perfil de crescimento das diferentes estirpes de *H. seropedicae* mutantes EL $\Delta$ glnE (M) em comparação com a estirpe parental selvagem SMR1 (S). O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica, a um comprimento de onda de 600 nm, das culturas durante o tempo. Parâmetros cinéticos de crescimento com as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio.  $\mu$  é dado como taxa de crescimento e G como tempo de geração (DO por hora).

### 3.2.3. Atividades da GS

O modelo de regulação da enzima GS foi bem descrito principalmente em *E. coli* e em *R. rubrum* (Anderson & Stadtman, 1970; Jiang & Ninfa, 2011; Jonsson et al., 2009). Nesses modelos mais bem estudados, a GS é regulada em dois níveis distintos: por moduladores alostéricos e por modificação pós-traducional catalisada pela enzima GlnE. Nesses organismos a atividade da GS é inibida com adenilação em altos níveis de nitrogênio a fim de regular a assimilação de amônio. Para verificar o efeito da deleção de *glnE* na assimilação do amônio, nós avaliamos a atividade biossintética da enzima GS *in vivo*. Duas condições diferentes de nitrogênio foram estabelecidas: Glutamato 0,5 mM e cloreto de amônio 20 mM. O resultado está mostrado na figura 12.

. Os resultados mostrados na figura 12 indicam que em meio com alto amônio, a atividade da GS da estirpe mutante foi substancialmente menor do que a selvagem, conforme esperado. De acordo com os modelos ortólogos de regulação de GS já descritos, em alto amônio a GS é adenilada, causando uma diminuição na atividade. Como a estirpe mutante testada não possui GlnE, a GS em alto amônio nesse mutante não está

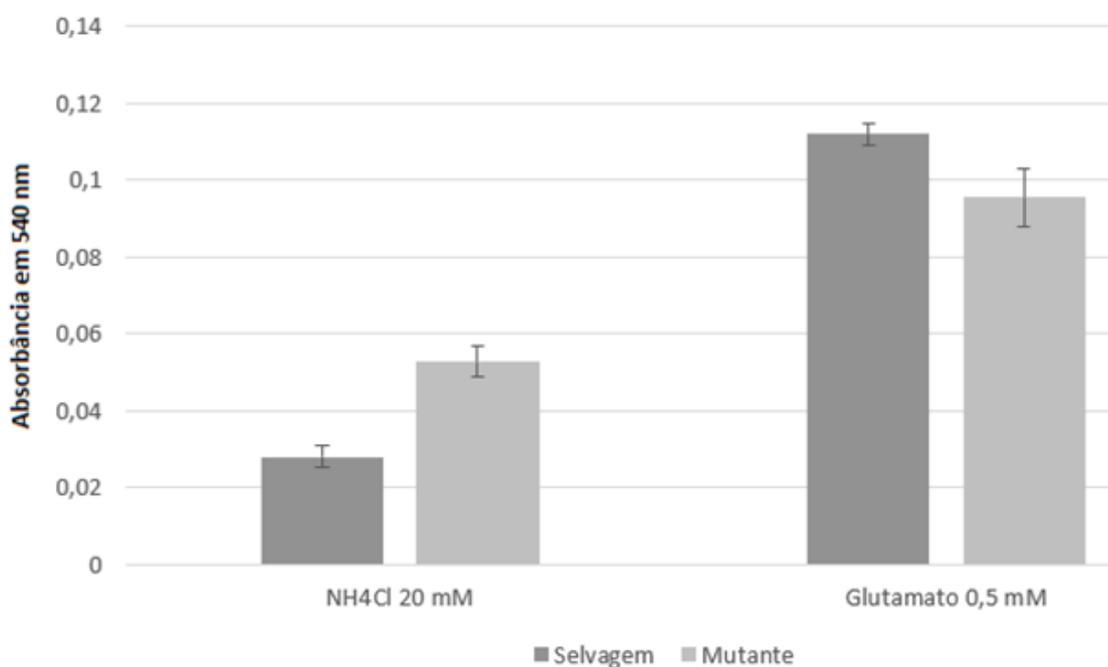
modificada. Logo, a diferença no nível de atividade de GS entre a estirpe mutante EL $\Delta$ glnE e selvagem em alto amônio reflete a inibição desta enzima causada pela sua adenililação. No caso da atividade biossintética da GS de células crescendo em meio com glutamato como única fonte de nitrogênio, uma condição que reflete baixa disponibilidade de nitrogênio, o resultado obtido foi diferente. Nesse caso, a atividade biossintética da estirpe mutante foi semelhante à encontrada para a estirpe selvagem, demonstrando que nessas condições a ausência de GlnE não exerce nenhum efeito sobre a célula. Esse resultado é esperado, já que nessas condições, espera-se que a enzima GS esteja com alta atividade, em sua forma não modificada. Assim, em condições limitantes de nitrogênio, a ausência de GlnE não interfere no estado de modificação de GS.

Esses resultados ajudam a explicar outras duas constatações anteriores apresentadas aqui nesse trabalho. Primeiro, a alta atividade de GS em meio com alto amônio explica a fase lag estendida da estirpe mutante no meio com 20mM de amônio no experimento da figura 11. Como a atividade de GS é claramente afetada pela mutação nessa condição, isso explica a toxicidade do amônio observada em alto amônio. A atividade aumentada de GS deve causar um desbalanceamento metabólico, que culmina com esse atraso no início da fase logarítmica do crescimento. Corroborando com essa hipótese, em *A. vinelandii* o mutante *glnE* só pôde ser isolado em meio diazotrófico, na ausência de nitrogênio fixado (Mus et al., 2017). Altas atividades de GS também foram relacionadas com a dificuldade de obtenção de mutantes PII em *R. rubrum* (Zhang et al., 2006). No entanto, os mutantes PII de *R. rubrum* foram isolados quando em conjunto com outras mutações supressoras, todas que diminuía a atividade de GS, mostrando novamente a toxicidade do excesso de atividade dessa enzima (Zhang et al., 2006).

Uma segunda constatação que pode ser implicada pelo observado no experimento da figura 12 é a dificuldade que nós encontramos para isolar a estirpe duplo recombinante em meio de cultura com alto amônio. Como no segundo evento há chances teóricas iguais de ser eliminada a versão deletada do gene *glnE* ou a versão selvagem, ao crescer por duas gerações as estirpes recombinantes, a alta concentração de amônio resultava em um atraso do crescimento da estirpe mutante, favorecendo aquelas que haviam retornado ao genótipo selvagem. Quando fizemos o cultivo em meio com glutamato para seleção do duplo recombinante, a frequência de duplos recombinantes encontrados foi alta.

Chama ainda atenção no resultado mostrado na figura 12 um nível de atividade de GS muito maior para ambas estirpes cultivadas em meio glutamato em relação ao meio

amônio. Esse resultado não era esperado. No entanto, como a densidade celular era muito menor no meio glutamato, há um viés de quantidade de células usadas para a mensuração da atividade de GS. Nós procuramos amenizar essas diferenças ao quantificar a proteína total e adicionar a mesma quantidade definida de proteína em cada reação. No entanto eventuais erros nessa quantificação podem ocasionar grandes diferenças na atividade, como observado. Não podemos ainda excluir a possibilidade de a expressão de GS estar maior nas bactérias crescendo em meio glutamato. Essas hipóteses serão verificadas em experimentos futuros.

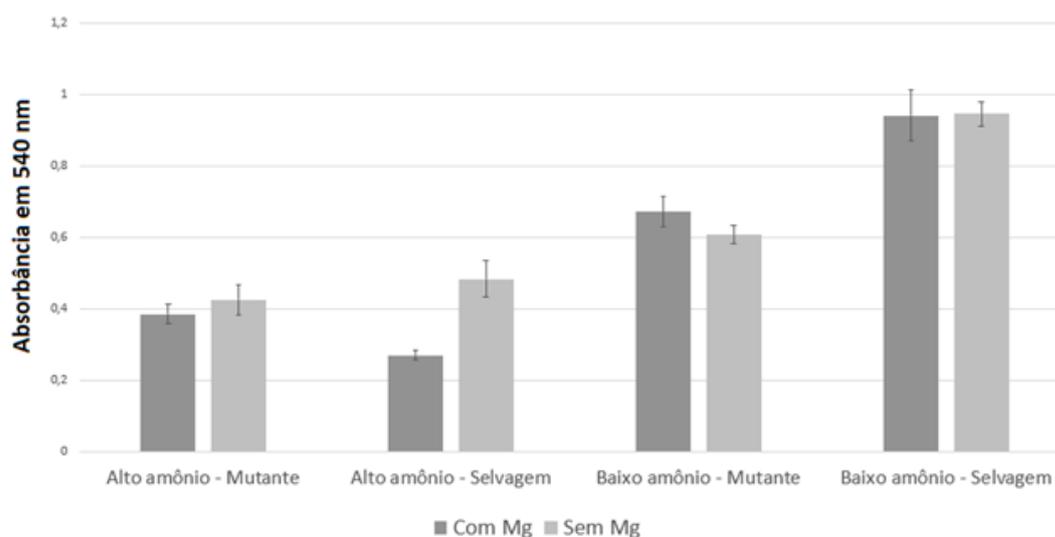


**Figura 12.** Atividade biossintética da enzima GS das estirpes mutante e selvagem, crescida em diferentes condições de nitrogênio. Glutamato 0,5 mM e cloreto de amônio 20 mM.

Além da atividade biossintética, a enzima GS catalisa uma versão reversa da reação, chamada de  $\gamma$ -glutamil transferase ( $\gamma$ -GT). Nessa reação, a enzima catalisa a transferência do grupamento  $\gamma$ -glutamil da glutamina para o substrato artificial hidroxilamina para formar  $\gamma$  glutamilhidroxamato. Essa atividade é avaliada com frequência nos trabalhos sobre GS, já que ensaios de caracterização desta atividade da enzima GS de *E. coli* demonstraram em diversas condições que a forma adenilada tem a atividade  $\gamma$ -GT inibida por íons  $Mg^{+2}$  (Stadtman et al., 1979). Desta forma, é possível observar o estado de adenilação da GS testando a inibição da atividade  $\gamma$ -GT por íons

$Mg^{2+}$ . Os resultados da atividade  $\gamma$ -GT das estirpes EL $\Delta$ glnE e selvagem estão mostrados na figura 13.

Comparando as reações  $\gamma$ -GT (Figura 13) com e sem íons  $Mg^{2+}$  da estirpe mutante em alto amônio, as atividades foram semelhantes, indicando que GS não está adenililada. Já a estirpe selvagem nessa condição possui maior atividade sem  $Mg^{2+}$  quando comparada a reação com a reação na presença do íon, indicando um estado adenililado de GS. Na condição com baixo amônio, a estirpe selvagem possui atividade semelhante, tanto com íons magnésio quanto sem, indicando um estado desadenililado. Situação que se repete no mutante, atividades semelhantes com e sem magnésio indicando um estado desadenililado. Resultado esperado, já que GS sem GlnE não seria adenililada. Ou seja, nós demonstramos com esse experimento de reação  $\gamma$ -GT que a GS da estirpe selvagem SmRI está adenililada em meio com alto amônio, e não adenililada em meio com baixo amônio, enquanto que a GS da estirpe mutante EL $\Delta$ glnE permanece sempre não modificada.



**Figura 13.** Atividade  $\gamma$ -GT da enzima GS, estirpes mutante e selvagem, crescida em diferentes condições de nitrogênio. Sendo alto amônio a cultura crescida com cloreto de amônio 20 mM e baixo amônio a condição com Glutamato 0,5 mM. Indicação Mg para as reações que tiveram 100 mM do íon  $Mg^{+2}$ .

### 3.2.4 Atividade de nitrogenase

*H. seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio em condições de microaerofilia e em concentrações limitantes de nitrogênio fixado (Noindorf et al., 2011). Mutações que causam uma diminuição da atividade de nitrogenase podem afetar tanto a expressão dos genes estruturais do complexo enzimático da nitrogenase, quanto a regulação pós-traducional da nitrogenase. Para verificar o efeito da deleção de *glnE*, nós avaliamos a atividade da nitrogenase em meio semi-sólido da estirpe ELΔ*glnE* através da capacidade de redução do acetileno a etileno. O resultado está mostrado na tabela 7.

**Tabela 7** - Atividade da nitrogenase da estirpe mutante em comparação com a selvagem. Atividade mostrada em nano mols de etileno por micrograma de proteína por minuto. As médias foram comparadas pelo teste T, e as letras superescritas indicam grupos com diferença significativa

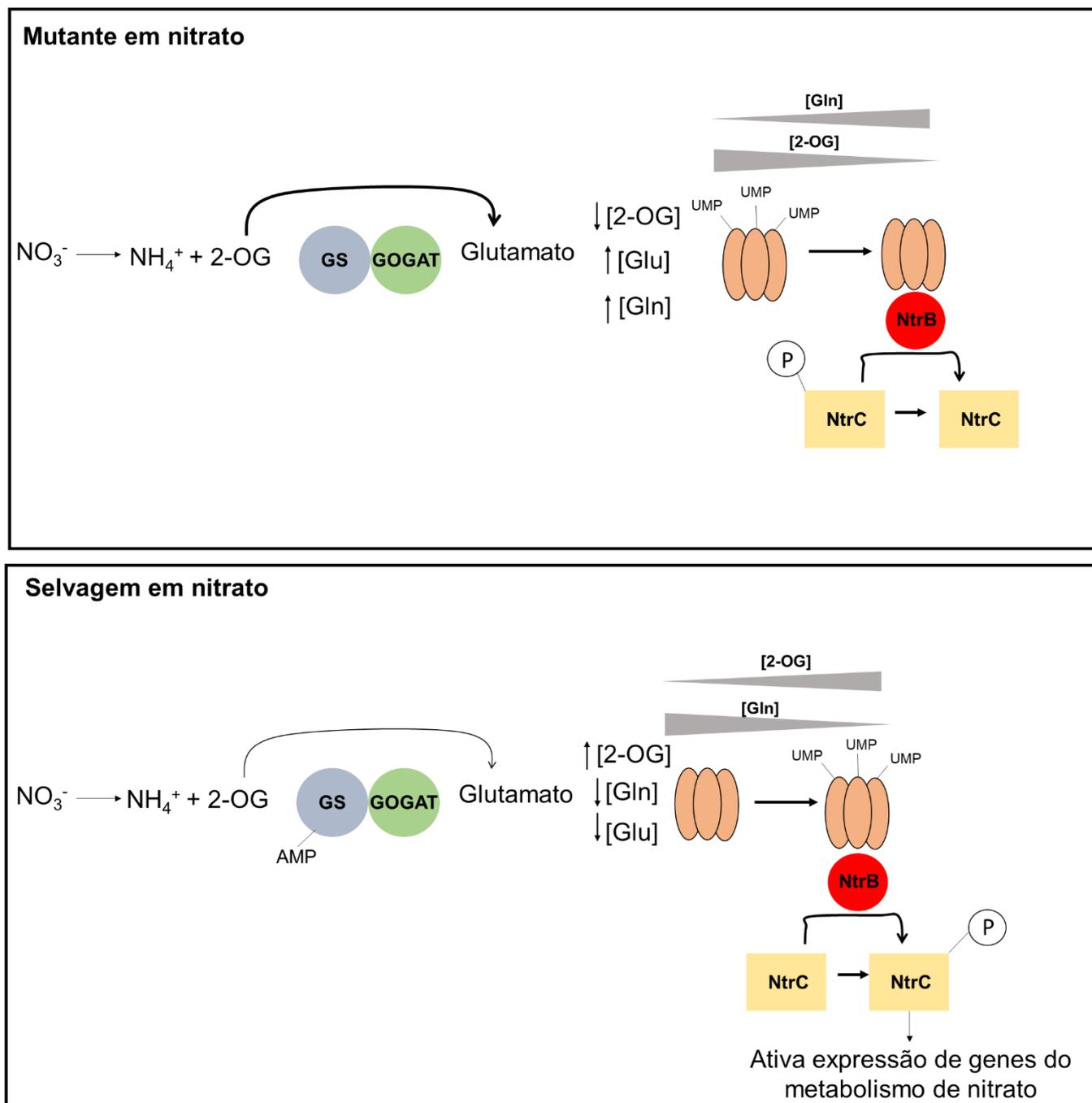
<b>Estirpe</b>	<b>Atividade</b>
SmrI	18,30±1,78 <sup>a</sup>
ELΔ <i>glnE</i>	24,87±4,73 <sup>b</sup>

Os resultados mostrados na tabela 7 indicam que a atividade de nitrogenase da estirpe mutante foi levemente superior à da selvagem. Um resultado semelhante também foi encontrado em *A. vinelandii* (Mus et al, 2017). Como as condições de fixação de nitrogênio caracterizam-se pela baixa disponibilidade de nitrogênio fixado, espera-se que a GS da estirpe selvagem, nessas condições, se encontre no estado não adenililado, logo, semelhante à estirpe mutante. Entretanto, a pequena diferença da atividade da estirpe selvagem indica que é possível que, mesmo em condições de fixação de nitrogênio, a GS da estirpe selvagem esteja parcialmente adenililada, e que essa adenililação possa, de alguma forma indireta, interferir na fixação de nitrogênio, possivelmente por interferir nas concentrações intracelulares de metabólitos reguladores chave. O aprofundamento da explicação desse fenótipo através de análises metabólicas poderá contribuir para o melhor entendimento da regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, nós construímos uma estirpe de *H. seropedicae* contendo deleção no gene *glnE*. As primeiras caracterizações fenotípicas dessa estirpe mutante são apresentadas. Entre elas, o perfil de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio, mostrando que a ausência de GlnE impede a bactéria de crescer em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, e que altas concentrações de amônio sejam tóxicas nas fases iniciais do crescimento bacteriano. A estirpe mutante tem atividade de GS aumentada em altas concentrações de amônio, indicando que nessas condições GlnE diminui a atividade de GS. Mostramos ainda que a deleção do gene *glnE* provoca um pequeno aumento da atividade nitrogenase da bactéria.

O fenótipo de crescimento de nitrato do mutante EL $\Delta$ glnE aqui mostrado permitiu a construção do modelo mostrado na figura 14. Como o mutante EL $\Delta$ glnE não é capaz de metabolizar nitrato, podemos concluir que a adenililação de GS, com a sua consequente diminuição de atividade catalítica, é uma etapa importante no metabolismo de assimilação de nitrato. No modelo aqui proposto, no meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio a GS da estirpe selvagem é adenililada e tem baixa atividade catalítica, sendo o fator limitante para a assimilação de nitrogênio. Nessas condições, as concentrações intracelulares de 2-OG são altas, enquanto que de glutamato e glutamina são baixas, promovendo a uridililação de PII e a consequente fosforilação de NtrC, a qual vai, por sua vez, ativar a expressão de genes de resposta à essas condições. Dentre esses genes estão aqueles relacionados com o metabolismo de nitrato. Na estirpe mutante EL $\Delta$ glnE, não há adenililação de GS. Dessa forma, GS apresenta uma alta taxa catalítica, o que causa uma diminuição nos níveis de 2-OG e um aumento dos níveis de glutamina e glutamato. Esse perfil de metabólitos leva a uma desuridililação de PII que, por interação com NtrB, promove a desfosforilação de NtrC. Nessa condição NtrC não é capaz de ativar a transcrição dos genes de metabolismo de nitrato, explicando o resultado encontrado.



**Figura 14.** Modelo esquemático da regulação da assimilação de nitrato em *H. seropedicae*

## 5. REFERÊNCIAS

- Anderson, W. B., & Stadtman, E. R. (1970). Glutamine synthetase deadenylylation: A phosphorolytic reaction yielding ADP as nucleotide product. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 41(3), 704–709.
- Arcondéguy, T., Jack, R., & Merrick, M. (2001). PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 80–105.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., & Döbereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(1), 86–93.
- Batista, M. B. (2011). *Construção e caracterização de estirpes mutantes de Herbaspirillum seropedicae nos genes fnr1, fnr2 e fnr3*.
- Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F., & Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 129(2), 1001–1009.
- Bonato, P., Alves, L. R., Osaki, J. H., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Zhang, N., Schumacher, J., Buck, M., Wassem, R., & others. (2016). The NtrY--NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *The FEBS Journal*, 283(21), 3919–3930.
- Bonato, P., Batista, M. B., Camilios-Neto, D., Pankievicz, V. C. S., Tadra-Sfeir, M. Z., Monteiro, R. A., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Chubatsu, L. S., Wassem, R., & others. (2016). RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Environmental Microbiology*, 18(8), 2677–2688.
- Bonato, A. C., Souza, E. M., Oliveira, M. A. S., Monteiro, R. A., Chubatsu, L. S., Huergo, L. F., & Pedrosa, F. O. (2012). Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro. *Archives of Microbiology*, 194(8), 643–652.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Carr, P. D., Cheah, E., Suffolk, P. M., Vasudevan, S. G., Dixon, N. E., & Ollis, D. L. (1996). X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52(1), 93–104.
- Carroll, P., Pashley, C. A., & Parish, T. (2008). Functional analysis of GlnE, an essential adenylyl transferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 190(14), 4894–4902.
- Clancy, P., Xu, Y., van Heeswijk, W. C., Vasudevan, S. G., & Ollis, D. L. (2007). The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain. *The FEBS Journal*, 274(11), 2865–2877.

- Commoner, B. (1977). Cost-risk-benefit analysis of nitrogen fertilization: A case history. *Ambio*, 157–161.
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621–631.
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. U., & Rotstein, S. H. (2000). Structure--function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1–2), 122–145.
- Emori, M. T., Tomazini, L. F., Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Chubatsu, L. S., & Oliveira, M. A. S. (2018). The deuridylylation activity of *Herbaspirillum seropedicae* GlnD protein is regulated by the glutamine: 2-oxoglutarate ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1866(12), 1216–1223.
- Fernández, E., Llamas, Á., & Galván, A. (2009). Nitrogen assimilation and its regulation. In *The Chlamydomonas sourcebook* (pp. 69–113). Elsevier.
- Geng, Y., Cao, G., Wang, L., & Wang, S. (2019). Effects of equal chemical fertilizer substitutions with organic manure on yield, dry matter, and nitrogen uptake of spring maize and soil nitrogen distribution. *PloS One*, 14(7), e0219512.
- Guimarães, L. F. S. (n.d.). *Análise da expressão dos genes do metabolismo de nitrato nas estirpes SMR1 e DCP286A de Herbaspirillum Seropedicae por PCR em tempo real*.
- Helling, R. B. (1998). Pathway Choice in Glutamate Synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4571–4575.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59.
- Huergo, L. F., Chandra, G., & Merrick, M. (2013). PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 251–283.
- Jaggi, R., van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., Ollis, D. L., & Vasudevan, S. G. (1997). The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. *The EMBO Journal*, 16(18), 5562–5571.
- James, E. K., Olivares, F. L., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. (1997). *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, 48(3), 785–798.
- Jiang, P., & Ninfa, A. J. (2011). A source of ultrasensitivity in the glutamine response of the bicyclic cascade system controlling glutamine synthetase adenylylation state and activity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 50(50), 10929–10940.
- Jiang, P., Peliska, J. A., & Ninfa, A. J. (1998). Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37(37), 12795–12801.
- Jonsson, A., Nordlund, S., & Teixeira, P. F. (2009). Reduced activity of glutamine synthetase in *Rhodospirillum rubrum* mutants lacking the adenylyltransferase

- GlnE. *Research in Microbiology*, 160(8), 581–584.
- Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Chandran, P., & Ninfa, A. J. (1994). 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.
- Klassen, G., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Funayama, S., & Rigo, L. U. (1997). Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(9), 887–891.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D., & Weiss, D. (1989). Expression of sigma 54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiological Reviews*, 53(3), 367.
- Merrick, M. (2015). Post-translational modification of PII signal transduction proteins. *Frontiers in Microbiology*, 5, 763.
- Merrick, M. J., & Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(4), 604–622.
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wassem, R., Marin, A. M., Brusamarello-Santos, L. C. C., Schmidt, M. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Pankievicz, V. C. S., Cruz, L. M., Chubatsu, L. S., & others. (2012). *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, 356(1), 175–196.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., & Castillo, F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology*, 181(21), 6573–6584.
- Morozkina, E. V., & Zvyagil'skaya, R. A. (2007). Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1151–1160.
- Mus, F., Tseng, A., Dixon, R., & Peters, J. W. (2017). Diazotrophic growth allows *Azotobacter vinelandii* to overcome the deleterious effects of a *glnE* deletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13).
- Noindorf, L., Bonatto, A. C., Monteiro, R. A., Souza, E. M., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., Steffens, M. B. R., & Chubatsu, L. S. (2011). Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *BMC Microbiology*, 11(1), 1–8.
- Noriega, C. E., Lin, H.-Y., Chen, L.-L., Williams, S. B., & Stewart, V. (2010). Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX--NarL and NarQ--NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 75(2), 394–412.
- Pankievicz, V. C. S., do Amaral, F. P., Santos, K. F. D. N., Agtuca, B., Xu, Y., Schueller, M. J., Arisi, A. C. M., Steffens, M. B. R., de Souza, E. M., Pedrosa, F. O., & others. (2015). Robust biological nitrogen fixation in a model grass--bacterial association. *The Plant Journal*, 81(6), 907–919.
- Pedrosa, F. de O., & Yates, M. G. (1984). Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS*

*Microbiology Letters*, 23(1), 95–101.

- Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wassem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., Fernandez, M. A., Fungaro, M. H. P., Grisard, E. C., & Hungria, M. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 7(5), e1002064.
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., & Ladha, J. K. (1995). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? In *Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems* (pp. 3–28). Springer.
- Persuhn, D. C., Souza, E. M., Steffens, M. B. R., Pedrosa, F. O., Yates, M. G., & Rigo, L. U. (2000). The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiology Letters*, 192(2), 217–221.
- Postgate, J. R. (1982). Biological nitrogen fixation: fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 296(1082), 375–385.
- Radchenko, M., & Merrick, M. (2011). The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 189–194.
- Rehm, N., Buchinger, S., Strösser, J., Dotzauer, A., Walter, B., Hans, S., Bathe, B., Schomburg, D., Krämer, R., & Burkovski, A. (2010). Impact of adenylyltransferase GlnE on nitrogen starvation response in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 145(3), 244–252.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., & others. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Issue Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sanders, D. A., Gillece-Castro, B. L., Burlingame, A. L., & Koshland, D. E. (1992). Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. *Journal of Bacteriology*, 174(15), 5117–5122.
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 1–22.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). 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.
- Schulten, H.-R., & Schnitzer, M. (1997). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 26(1), 1–15.
- Schwab, S., Ramos, H. J., Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Yates, M. G., Chubatsu, L. S., & Rigo, L. U. (2007). Identification of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. *Archives of Microbiology*, 187(5), 379–386.
- Simon, R., Prierer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1(9), 784–791.

- Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Rigo, L. U., Machado, H. B., & Yates, M. G. (2000). 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.
- Stadtman, E. R., Smyrniotis, P. Z., Davis, J. N., & Wittenberger, M. E. (1979). Enzymic procedures for determining the average state of adenylation of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Analytical Biochemistry*, *95*(1), 275–285.
- Stewart, V., & Bledsoe, P. J. (2003). Synthetic lac operator substitutions for studying the nitrate- and nitrite-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *185*(7), 2104–2111.
- Truan, D., Huergo, L. F., Chubatsu, L. S., Merrick, M., Li, X.-D., & Winkler, F. K. (2010). A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. *Journal of Molecular Biology*, *400*(3), 531–539.
- van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., & Boogerd, F. C. (2013). Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *77*(4), 628–695.
- Zhang, Y., Pohlmann, E. L., Conrad, M. C., & Roberts, G. P. (2006). The poor growth of *Rhodospirillum rubrum* mutants lacking PII proteins is due to an excess of glutamine synthetase activity. *Molecular Microbiology*, *61*(2), 497–510.