

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

EDUARDO SABATINE LOPES

Regulação *in vitro* da enzima GlnE de *Herbaspirillum seropedicae*

Maringá

2021

EDUARDO SABATINE LOPES

Regulação *in vitro* da enzima GlnE de *Herbaspirillum seropedicae*

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)

L864r

Lopes, Eduardo Sabatine

Regulação *in vitro* da enzima GlnE de *Herbaspirillum seropedicae* / Eduardo Sabatine  
Lopes. -- Maringá, PR, 2021.  
58 f.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. Regulação. 3. Fixação de Nitrogênio. 4. Sistema Ntr.  
5. Proteínas PII . 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. 572.4

EDUARDO SABATINE LOPES

Regulação *in vitro* da enzima GlnE de *Herbaspirillum seropedicae*

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.

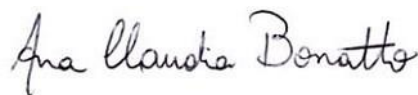
Aprovado em: 15/12/2021

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Marco Aurelio Schuler de Oliveira (Orientador)  
Universidade Estadual de Maringá



---

Profa. Dra. Ana Cláudia Bonatto  
Universidade Federal do Paraná



---

Prof. Dr. Luís Paulo Silveira Alves  
Universidade Federal do Paraná

## **BIOGRAFIA**

Eduardo Sabatine Lopes nasceu em Maringá, PR, em 29 de janeiro de 1998. Sempre foi interessado por Ciências. Durante o ensino fundamental e médio estudou em escola pública, na qual frequentava oficinas de Biologia oferecidas por alunos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) onde tinha a curiosidade científica fomentada. No segundo ano do ensino médio, ganhou uma bolsa para o Curso Técnico em Biotecnologia oferecido pelo SENAI-PR. Durante o curso, que durou dois anos, teve contato com as primeiras noções de bioquímica e biologia molecular, áreas pelas quais desenvolveu grande paixão. Em 2016 iniciou os estudos da graduação em Ciências Biológicas na UEM, durante a qual pode realizar atividades de iniciação científica em bioquímica e biologia molecular. Em 2020, após um ano de estudo, ingressou no curso de mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular, onde sob orientação do prof. Marco Aurélio Schüler de Oliveira, desenvolveu o presente trabalho. Como um bom seguidor de Carl Sagan, acredita que a Ciência é como uma vela no escuro e que “em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço ao professor Marco Aurélio pela orientação, não só durante a execução deste trabalho, mas durante todo o período em que eu estou no laboratório. Sou grato pela paciência dedicada a mim e por todo conhecimento compartilhado comigo.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Procariotos: Larissa Tomazini, Ana, Lorena, Amanda, Eduard(ã)o, Bárbara, Josi, Larissa Ricardini e Nunis, pelo companheirismo e auxílios (que não foram poucos) no dia-a-dia, risadas, músicas, etc etc... O desenvolvimento da pesquisa não teria sido o mesmo sem eles.

Também sou grato ao professor Paulo pelas ajudas nas modelagens computacionais, que embora não estejam nesse trabalho, sem dúvidas foram e serão de muita utilidade.

Sou grato aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC) pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas, bem como aos colegas de “classe”. Também agradeço à Erica, secretária do PBC, pelas ajudas com as burocracias, sobretudo nos dias finais.

Eu agradeço à minha família por todo apoio e encorajamento ao longo desses anos. Sem todo suporte que eu recebo e recebi não seria possível realizar a graduação, muito menos essa pesquisa. Eu agradeço profundamente à Lorena pela paciência e compreensão que tem tido comigo ao longo desses 3 últimos anos. Seu carinho me faz suportar os dias difíceis.

Por fim, agradeço ao CNPq por ter pago meu salário enquanto me dedicava exclusivamente à pesquisa.

## **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 *Biochimie* (ISSN: 0300-9084), com modificações para facilitar o entendimento do texto.

**Regulação *in vitro* da enzima GlnE de *Herbaspirillum*  
*seropedicae***

Lopes, E.S. & Oliveira, M.A.S.

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



## SUMÁRIO

<b>1.Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1.Fixação Biológica de Nitrogênio.....	14
1.2. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	14
1.3.Assimilação de amônio em bactérias.....	15
1.4.Regulação pelo Sistema Ntr.....	17
1.5.Enzima GlnE.....	22
1.6.Justificativa.....	24
1.7.Objetivos.....	24
1.7.1.Objetivo geral.....	24
1.7.2.Objetivos específicos.....	24
<b>2.Materiais e Métodos.....</b>	<b>25</b>
2.1.Variantes truncadas.....	25
2.2.Bactérias e Vetores.....	25
2.3.Meios de cultura para bactérias.....	26
2.4.Transformação bacteriana por choque térmico.....	26
2.5.Expressão de proteínas.....	27
2.5.1.Expressão de GlnE-N, GlnE-C e GlnB.....	27
2.5.2.Expressão de GS em alto e baixo nitrogênio.....	27
2.6.Purificação de Proteínas.....	27
2.7.Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	28
2.8.Western-blot.....	28
2.9.Uridililação de GlnB <i>in vitro</i> .....	29
2.10.Adenililação de GS <i>in vitro</i> .....	29
2.11.Desadenililação de GS <i>in vitro</i> .....	29
2.12.Ensaio de atividade $\gamma$ -GT de GS.....	30
2.13.Ensaio de atividade biossintética de GS.....	30
2.14.Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF).....	31
2.15.Ensaio de co-precipitação ( <i>Pull-down</i> ).....	31

<b>3.Resultados.....</b>	<b>33</b>
3.1. Determinação do estado de modificação pós-traducional de GS expressa em condições de alto e baixo nitrogênio.....	33
3.2.Regulação da atividade AR de GlnE.....	34
3.3.Caracterização da interação de GlnE-N com ATP e ADP.....	38
3.4.Regulação da atividade ATase de GlnE por GlnB e GlnB-UMP <sub>3</sub> .....	42
3.5.Caracterização da interação entre GlnE-N e GlnB.....	44
<b>4.Discussão.....</b>	<b>46</b>
<b>5.Referências.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Vias de assimilação de amônio em bactérias.....	16
<b>Figura 2</b> – Modelo estrutural da enzima Glutamina Sintetase.....	16
<b>Figura 3</b> – Modelo estrutural da proteína GlnB.....	18
<b>Figura 4</b> – Modelo de regulação transcricional do gene <i>glnA</i> .....	19
<b>Figura 5</b> – Modelo de regulação pós-traducional de GS em <i>E. coli</i> .....	20
<b>Figura 6</b> – Modelos estruturais da GlnE de <i>E. coli</i> .....	23
<b>Figura 7</b> – Variantes truncadas em relação a GlnE inteira.....	25
<b>Figura 8</b> – Determinação do estado de modificação pós-traducional de GS.....	34
<b>Figura 9</b> – Atividade de GlnE-N na condição ATP + GlnB/GlnB-UMP <sub>3</sub> .....	35
<b>Figura 10</b> – Atividade de GlnE-N com ATP/2-OG + GlnB/GlnB-UMP <sub>3</sub> .....	36
<b>Figura 11</b> – Atividade de GlnE-N na condição ADP + GlnB/GlnB-UMP <sub>3</sub> .....	37
<b>Figura 12</b> – Regulação de GlnE-N por moduladores alostéricos.....	38
<b>Figura 13</b> – DSF da interação de GlnE-N com ATP.....	39
<b>Figura 14</b> - DSF da interação de GlnE-N com ADP.....	40
<b>Figura 15</b> – Curvas de saturação das razões ATP/ADP e ADP/ATP.....	41
<b>Figura 16</b> – Atividade de GlnE-C na presença de GlnB e GlnB-UMP <sub>3</sub> .....	42
<b>Figura 17</b> – Atividade de GlnE-C com GlnB/GlnB-UMP <sub>3</sub> + 2-OG.....	43
<b>Figura 18</b> – Atividade biossintética de GS e GS-AMP.....	44
<b>Figura 19</b> – Ensaio de co-precipitação para interação de GlnE-N com GlnB.....	44
<b>Figura 20</b> – Modelo de regulação da atividade de GlnE em <i>H. seropedicae</i> .....	51

## Resumo Geral

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio capaz de colonizar os tecidos internos de gramíneas, como milho, sorgo, arroz e cana-de-açúcar. O nitrogênio fixado por *H. seropedicae* pode ser incorporado pela biomassa da planta hospedeira e estimular o crescimento vegetal, de forma que essa bactéria pode ser utilizada como um biofertilizante. Para isso, a descrição do metabolismo de nitrogênio é fundamental, sobretudo quanto a regulação do sistema, afim de que possam ser realizadas modificações por engenharia genética que aumentem a eficiência da excreção de amônio a ser assimilado pela planta hospedeira.

Nas bactérias, a via da enzima Glutamina Sintetase (GS) é principal forma de assimilação de amônio. A enzima GS é regulada por modificação pós-traducional, uma adenililação reversível catalisada pela enzima bifuncional GlnE. O domínio N-terminal de GlnE tem atividade adenilil-removedora (AR), o central supostamente tem atividade regulatória e o C-terminal tem atividade adenilil-transferase (ATase). A enzima GlnE é regulada pela proteína GlnB. A regulação de GlnE por GlnB aparentemente é variável entre organismos. Em *Escherichia coli* tanto GlnB quanto sua forma uridililada (GlnB-UMP<sub>3</sub>) exercem efeito regulatório sobre GlnE, sendo que para cada versão de GlnB há um sítio regulatório em GlnE. Por outro lado, em *Rhodospirillum rubrum* apenas a forma não-modificada regula a atividade de GlnE e há apenas um sítio para a interação dessas proteínas, localizado no domínio N-terminal. Em *H. seropedicae* não está claro qual é a função regulatória de GlnB sobre a atividade de GlnE. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório com GlnE inteira, sugerem que sua regulação é independente do estado de modificação de GlnB. Dessa forma, neste trabalho nós utilizamos duas construções truncadas de GlnE para determinar qual é a função regulatória de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> sobre os domínios isolados de GlnE.

Nossos resultados indicaram que as atividades dos domínios isolados não foram influenciadas por GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub>, mas que existe uma possível interação da forma não-uridililada com o domínio N-terminal. Nós também verificamos que o domínio N-terminal apresenta um sítio de sensibilidade à razão ATP/ADP, que é responsável pela regulação da atividade AR de GlnE. O modelo proposto para a regulação de GlnE em *H. seropedicae* é único dentre os descritos até o momento.

## **Resumo**

A enzima bifuncional GlnE é responsável pela regulação pós-traducional da enzima Glutamina Sintetase, que é central na assimilação de amônio em bactérias. Em *Escherichia coli* a atividade de GlnE é regulada por GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> em função dos níveis de nitrogênio intracelulares, sendo que cada forma da proteína possui um sítio de ligação próprio em GlnE. Entretanto, essa regulação é variável entre os organismos. Neste trabalho, nós utilizamos variantes truncadas de GlnE de *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria fixadora de nitrogênio, para verificar a influência das proteínas GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> na atividade dos domínios catalíticos isolados. Nossos resultados sugerem que GlnE possui um sítio de interação com GlnB localizado no domínio N-terminal e que essa interação é responsável pela regulação da atividade adenilil-transferase de GlnE. Nós também mostramos a existência de um sítio alostérico sensível à razão ATP/ADP em N-terminal, responsável pela regulação da atividade adenilil-removedora. O modelo proposto para a regulação de GlnE em *H. seropedicae* é único dentre os descritos até o momento.

**Palavras-chave:** Glutamina Sintetase; Proteínas PII; GlnE.

## **Abstract**

The bifunctional enzyme GlnE is responsible for post-translational regulation of the Glutamine Synthetase, which is central to ammonium assimilation in bacteria. In *Escherichia coli*, GlnE activity is regulated by GlnB and GlnB-UMP<sub>3</sub> as a function of intracellular nitrogen levels, with each protein form having its own binding site on GlnE. However, this regulation is variable among organisms. In the present study, we used truncated variants of GlnE from *Herbaspirillum seropedicae*, a nitrogen-fixing bacterium, to verify the influence of GlnB and GlnB-UMP<sub>3</sub> in the activity of the isolated catalytic domains of GlnE. Our results suggest that GlnE has an GlnB interaction site located in the N-terminal domain and that this interaction is responsible for the regulation of GlnE adenylyltransferase activity. We also show the existence of an allosteric site sensitive to the ATP/ADP ratio at N-terminal, responsible for the regulation of deadenylylation activity. The proposed model for GlnE regulation in *H. seropedicae* is unique among those described so far.

**Keywords:** Glutamine Synthetase; PII Proteins; GlnE.

## 1.Introdução

### 1.1.Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) ao íon amônio ( $NH_4^+$ ) desempenhado por microrganismos chamados diazotrofos. Os diazotrofos apresentam alta biodiversidade e estão distribuídos entre Archea e Bacteria. Os diazotrofos podem estabelecer associações com plantas de interesse econômico, como gramíneas. Nessas associações, as plantas são beneficiadas com o  $NH_4^+$  produzido pelos microrganismos, uma vez que o nitrogênio é limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal [1,2].

O processo de fixação biológica de nitrogênio e a interação planta-bactéria têm sido exploradas como uma alternativa biotecnológica ao uso de fertilizantes nitrogenados industriais, que estão relacionados à danos ambientais e que possuem alto custo de produção. No Brasil, a biofertilização tem sido empregada com sucesso, por exemplo, na produção de Soja, uma das principais *commodities* nacionais, na qual não há necessidade do uso de fertilização nitrogenada sintética, reduzindo o custo da produção na ordem de bilhões de dólares por ano [3].

A capacidade desses organismos de fixar nitrogênio é decorrente da presença dos genes *nif*, responsáveis pela estrutura e montagem do complexo enzimático da nitrogenase (EC 1.18.6.1). O ciclo catalítico da nitrogenase reduz  $N_2$  à  $NH_4^+$ , com um custo total de 16 mols de ATP por mol de  $N_2$  reduzido [4]. O amônio formado na reação da nitrogenase é assimilado pelo metabolismo bacteriano, porém quando em excesso na célula pode ser tóxico, sendo excretado para o meio extracelular. Por sua vez, o amônio excretado pela bactéria pode ser assimilado pelo metabolismo da planta hospedeira [5].

### 1.2.*Herbaspirillum seropedicae*

O diazotrofo endofítico *Herbaspirillum seropedicae* é uma  $\beta$ -proteobacteria Gram-negativa e vibrióide, cuja colonização de tecidos internos não causa danos à planta hospedeira [6, 7]. As associações *H. seropedicae*/planta têm sido observadas para diversas espécies de gramíneas economicamente importantes, como arroz, sorgo, milho e cana-de-açúcar [8, 9], sendo que o nitrogênio fixado pode ser incorporado na biomassa da planta hospedeira [10] e a inoculação da bactéria contribui para o crescimento vegetal [11].

Quando inoculado com *H. seropedicae*, o arroz apresenta aumento no peso seco (22% a 50%), no conteúdo total de carbono (15% a 50%) e no conteúdo total de nitrogênio (29% a 85%) 30 dias após a inoculação [12]. A co-inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp. em cana-de-açúcar, levou a um aumento da biomassa total na planta [13].

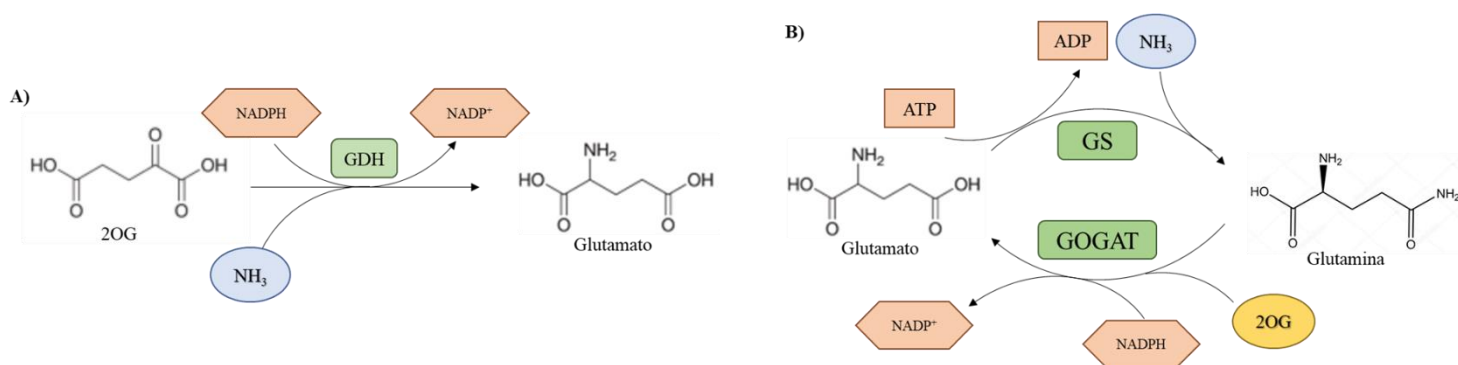
Esses dados sugerem que *H. seropedicae* apresenta um grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante. Para tal, a caracterização completa do metabolismo de nitrogênio desse organismo é fundamental para que ele seja aprimorado por ferramentas das Engenharias Genética, de Proteínas e Metabólica, afim de otimizar o processo de fixação de nitrogênio em benefício da planta hospedeira.

### 1.3. Assimilação de amônio em Bactérias

O amônio é combinado com o esqueleto carbônico de 2-oxoglutarato (2-OG) a partir de duas vias alternativas: a via da enzima glutamato desidrogenase (GDH - EC 1.4.1.2) e o ciclo GS-GOGAT, formado pelas enzimas glutamina sintetase (GS – EC 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT – EC 1.4.1.B5) [14].

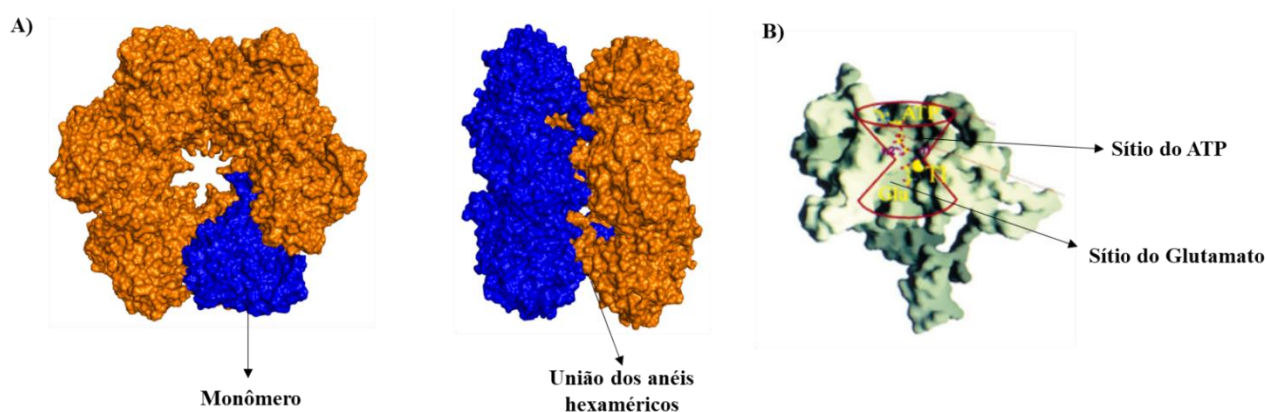
A via da enzima GDH (Fig.1 A) produz glutamato a partir da aminação do 2-OG. Alternativamente, ciclo GS-GOGAT (Fig.1 B) sintetiza glutamina a partir da aminação de glutamato catalisada pela GS. Em seguida, a GOGAT promove a transferência de um grupo amino da glutamina para o 2-OG, formando duas moléculas de glutamato. A utilização de cada via acontece de acordo com a disponibilidade intracelular de nitrogênio e energia: o ciclo GS-GOGAT é preferencial em condições limitantes de nitrogênio, pois o  $K_m$  da enzima GS para amônio é menor do que o  $K_m$  da GDH, enquanto que a via GDH é preferencial em condições limitantes de energia, visto que a reação da GS consome ATP [15, 16, 14, 17].





**Figura 1.** Vias de assimilação de amônio em bactérias. A assimilação pela via GDH (A) requer NADPH, mas não há gasto de ATP. No ciclo GS-GOGAT (B) deve ser investido ATP e NADH para a aaminação do 2-OG.

A enzima GS, codificada pelo gene *glnA*, possui uma estrutura dodecamérica formada por dois anéis hexaméricos unidos face-a-face a partir de 622 pontos de simetria em que atuam interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Fig. 2 A) [18]. O monômero de GS possui massa molecular de 51 kDa. Cada monômero apresenta um sítio ativo, de forma que a enzima possui 12 sítios no total. Os sítios ativos são estruturados na forma de um funil duplo, que favorece a transferência do grupo fosforil do ATP para um grupo carboxila do glutamato na primeira etapa da reação (Fig.2 B). Após a saída de ADP, o amônio promove um ataque nucleofílico sobre intermediário ativado  $\gamma$ -glutamil-fosfato, formando glutamina [18].



**Figura 2.** Modelo estrutural da enzima Glutamina Sintetase. A enzima é formada por 12 monômeros (A, esquerda) unidos por dois anéis hexaméricos (A, direita). A reação de GS é favorecida pela forma de funil duplo de seu sítio ativo (B). (Ref.: Imagem : Glutamina Sintetase de *Salmonella enterica* PBD 1LGR; Imagem B: adaptado de 19).

Como a reação de GS consome energia e é a principal forma de assimilação de amônio, o fluxo metabólico através dessa enzima é fortemente regulado em função do *status* energético e de nitrogênio intracelular [14]. A regulação de GS acontece pelo controle das concentrações de enzima, via regulação transcricional do gene *glnA*, e por controle cinético, via modulação alostérica negativa e por modificação pós-traducional, uma adenililação reversível. As regulações transcricional e pós-traducional estão relacionadas através do sistema Ntr. A modulação alostérica emprega um mecanismo de regulação cumulativa, onde cada modulador tem um efeito apenas parcial sobre a atividade da enzima, mas em conjunto o efeito regulatório é maior que soma dos efeitos individuais. A regulação alostérica é potencializada pela modificação pós-traducional. Em *Escherichia coli*, alguns moduladores negativos são aminoácidos (histidina, triptofano, glicina e alanina), AMP e CTP [20].

#### **1.4.Regulação pelo sistema Ntr**

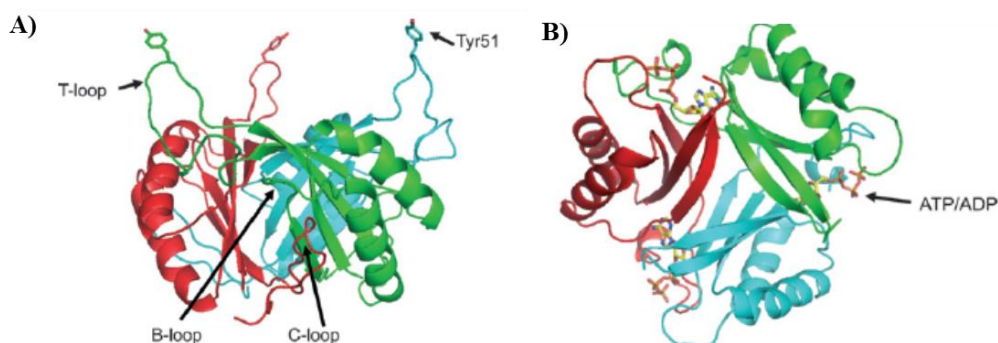
O sistema Ntr é o sistema geral de regulação do metabolismo de nitrogênio em bactérias e é responsável pela regulação da atividade de uma ampla gama de proteínas e enzimas, a nível transcricional e pós-traducional. De maneira geral, o sistema é composto por proteínas sensoras, transdutoras de sinal e efetoras, que são capazes de integrar sinais de nitrogênio, carbono e energia e promover uma resposta regulatória. Os sinais de nitrogênio e carbono são combinados na razão Glutamina/2-OG: como o 2-OG atua como aceptor de amônio, uma alta concentração de 2-OG representa baixo conteúdo de nitrogênio assimilado, ou seja, os sinais que representam o balanço carbono-nitrogênio são integrados de forma oposta. Já o sinal de energia é representado pela razão ATP/ADP. [17, 21].

O sistema Ntr melhor caracterizado até o momento é o de *E. coli*. Em *E. coli*, a principal proteína sensora é a enzima bifuncional GlnD (Uridililtransferase, EC-2.7.7.59), que é codificada pelo gene *glnD*. Sua atividade uridililtransferase (UTase) é ativada por 2-OG e ATP e inibida por glutamina; a atividade uridilil-removedora (UR) é ativada por glutamina. Assim, GlnD pode integrar o sinal do balanço carbono-nitrogênio. [22]. As proteínas PII (GlnB e GlnK) desempenham a transdução de sinal no sistema. Estruturalmente, as proteínas PII são homotrímeros e possuem um *loop* flexível conservado, conhecido como *loop*-T, que é responsável pela interação das proteínas PII com diversos alvos. O *loop*-T possui um resíduo de tirosina conservado, Y51, que é sítio

de modificação pós-traducional: uma uridililação reversível catalisada por GlnD (fig. 3a) [22].

A interação das proteínas PII com seus alvos também é regulada pela ligação de efetores alostéricos. Cada trîmero de PII apresenta três sítios para ligação de ATP ou ADP e 2-OG (fig. 3b). O ATP compete com o ADP pelo mesmo sítio de ligação, enquanto que o sítio para a ligação de 2-OG se forma após a ligação de MgATP; ATP e 2-OG estabelecem cooperatividade negativa [23]. Como as proteínas PII podem ligar ATP e ADP competitivamente, além de transdutoras de sinal via modificação pós-traducional, elas agem como sensores de energia do sistema, via modulação alostérica [23].

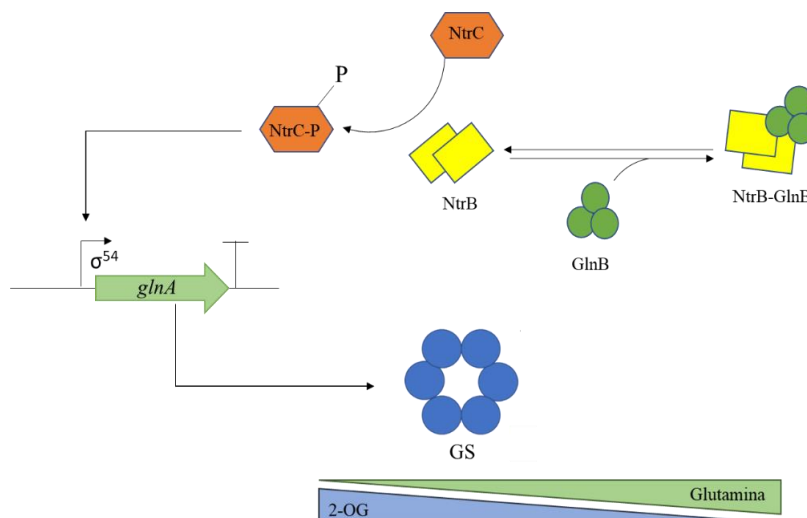
Em *H. seropedicae*, existem dois genes para proteínas PII, *glnB* e *glnK*. O gene *glnB* é monocistrônico e expresso constitutivamente. O gene *glnK* é co-transcrito com o gene *amtB*, que codifica um transportador de amônio, e *nlnA*, que codifica uma proteína detectada em extratos de membrana de células sob condições limitantes de nitrogênio, mas com função ainda desconhecida [24, 25].



**Figura 3.** Modelo estrutural da proteína GlnB de *Escherichia coli*: A proteína GlnB pertence a família PII e pode ser modificada covalentemente em um resíduo de tirosina conservado (Tyr51) localizado no T-loop (a) e ainda modulada alostericamente por ATP/ADP e 2-OG (b). (adaptado de 26).

Por fim, as proteínas efetoras do sistema Ntr são: o sistema de dois componentes NtrB-NtrC, responsáveis pela expressão de diversos genes, incluindo os genes *gln*, e a enzima bifuncional GlnE (Adenililtransferase, EC-2.7.7.42), responsável pela regulação pós-traducional de GS por adenililação reversível. Em *E. coli*, a transcrição do gene *glnA* depende do fator  $\sigma^{54}$  e é ativada pela proteína NtrC fosforilada. A fosforilação do ativador NtrC é desempenhada pela enzima cinase/fosfatase NtrB (EC-2.7.13.3), que por sua vez, é regulada por GlnB. Em condições limitantes de nitrogênio, GlnD uridilila GlnB, que no estado modificado não pode se ligar a NtrB. NtrB livre fosforila NtrC, que ativa a

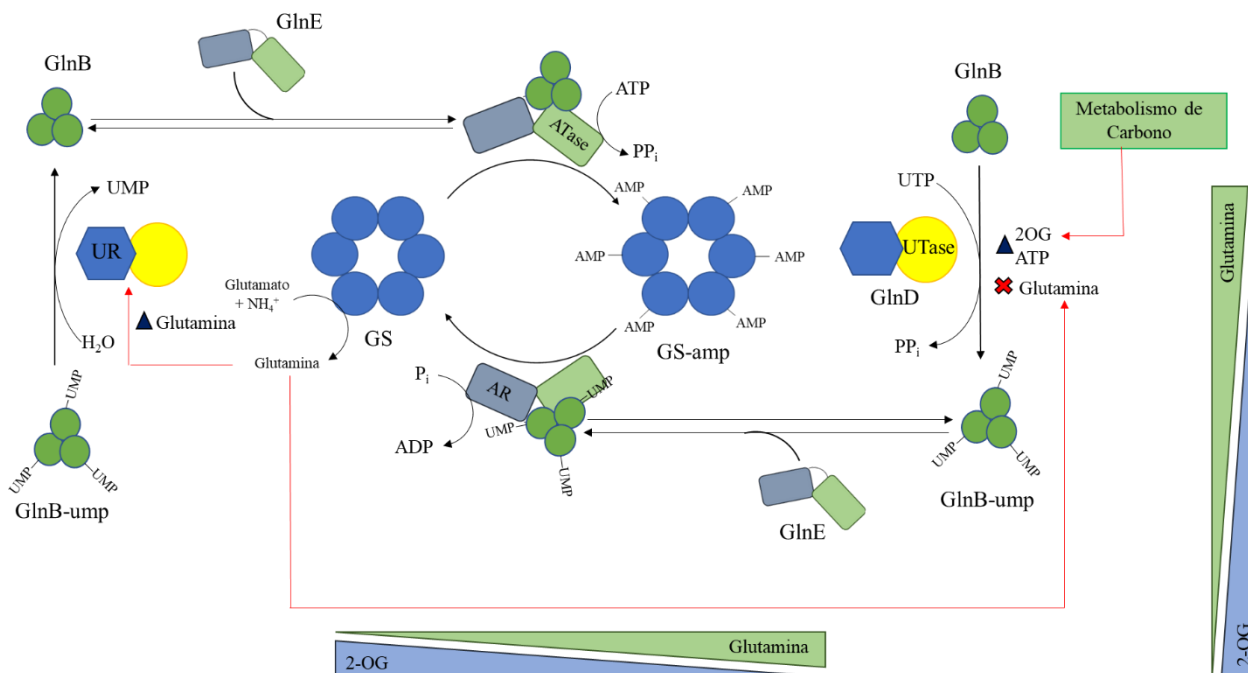
transcrição do gene *glnA*. Em condições de alto nitrogênio, GlnD desuridiliza GlnB, que no estado não modificado se liga à NtrB e impede a fosforilação de NtrC e, portanto, impede a transcrição do gene *glnA*. (fig. 4) [27, 28, 17, 29, 30].



**Figura 4.** Modelo da regulação transcricional do gene *glnA*, que codifica para a enzima Glutamina Sintetase, em *E. coli*. Em condições limitantes de nitrogênio, a uridililação de GlnB impede a formação de um complexo com a enzima NtrB, deixando-a livre para fosforilar o ativador NtrC. NtrC ativado promove a transcrição de *glnA*.

A regulação pós-traducional de GS por GlnE, em *E. coli*, envolve uma intrincada rede de transcrição de sinal. Quando as concentrações de nitrogênio são elevadas, a enzima GlnD remove grupos uridilil de GlnB. A proteína GlnB livre forma um novo complexo com GlnE, estimulando a atividade adenililtransferase (ATase). GlnE catalisa a adição dos grupos adenilil, em um resíduo de Tirosina (Tyr 398) de GS, a partir de ATP, tornando GS inativa. Em condições limitantes de nitrogênio, a enzima GlnD promove a uridililação de GlnB. GlnB-UMP<sub>3</sub> forma um complexo com a enzima GlnE, que tem sua

atividade adenilil-removedora (AR) ativada. GlnE remove grupos adenilil de GS por fosforólise, tornando-a ativa. (Fig. 5) [31].



**Figura 5.** Modelo de regulação de GS por modificação pós-traducional em *E. coli*. Em condições limitantes de nitrogênio (alto 2-OG), GlnD uridilila GlnB. GlnB-UMP<sub>3</sub> forma um complexo com GlnE e estimula a atividade AR, tornando GS ativa. Com o aumento das concentrações de glutamina, GlnD remove a modificação de GlnB, que forma um novo complexo com GlnE, incentivando a atividade ATase. GS é adenililada e inativada.

O sistema Ntr também é responsável pela regulação da captação de amônio via AmtB. A AmtB é uma proteína-canal fundamental para a captação de amônio exógeno à célula, expresso em condições limitantes de nitrogênio. Em condições de baixo amônio extracelular, o operon *glnKamtB* é expresso, sendo que AmtB é destinado a membrana plasmática para a captação de amônio e GlnK permanece no citoplasma, onde interage com ATP e 2-OG e também é uridililada. Nessa condição GlnK não pode interagir com AmtB [32]. O amônio extracelular sofre influxo para o citoplasma via AmtB, aumentando as concentrações citoplasmáticas dessa molécula. Nesse caso, inicialmente, a concentração de glutamina passa a aumentar, ao passo que a concentração de ATP e 2-OG diminuem. GlnD sensoria o aumento de glutamina e catalisa a desuridililação de GlnK, que também passa a ligar ADP. GlnK-ADP<sub>3</sub> interage com AmtB e bloqueia o influxo de amônio. O processo é revertido com a diminuição dos níveis de nitrogênio [32].

As proteínas PII também participam da regulação da fixação de nitrogênio por controle direto da atividade da nitrogenase ou por controle da transcrição dos genes *nif* em resposta aos níveis de nitrogênio fixado [33, 1]. No caso da regulação transcricional dos genes *nif*, a regulação é exercida por GlnK sobre a atividade de NifA, o qual é o regulador transcricional da nitrogenase. A regulação da atividade de NifA é variável entre organismos. Em *Azotobacter vinelandii*, a regulação de NifA depende da interação com NifL, uma proteína capaz de sentir o estado oxidativo da célula e inibir a atividade de NifA em condições de alto oxigênio. Nessa regulação, GlnK é a responsável por sinalizar os níveis de nitrogênio: em condições de alto nitrogênio fixado, GlnK forma um complexo com NifL e NifA, inativando a transcrição dos genes *nif*. Em baixas concentrações de nitrogênio, GlnK é uridilada por GlnD e não pode formar um complexo com NifL e NifA, permitindo a transcrição dos genes *nif*. [34].

Em organismos que não possuem NifL, a regulação de PII sobre NifA acontece por interação direta com o domínio regulatório GAF de NifA. Em *H. seropedicae*, em condições limitantes de nitrogênio, PII-UMP<sub>3</sub> interage diretamente com o domínio GAF impede que esse domínio reprima a atividade de NifA por regulação intramolecular, permitindo a transcrição dos genes *nif* [35].

Para além da regulação do metabolismo de nitrogênio, o sistema Ntr parece estar relacionado com a regulação de vias ligadas ao metabolismo de carbono. Um exemplo de regulação é sobre a atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC). A ACC que catalisa a primeira reação na síntese de ácidos graxos, que consiste na carboxilação do acetil-CoA formado malonil-CoA [36]. ACC é encontrada em procariotos na forma de três polipeptídeos separados, enquanto que nos eucariotos, podem ser encontrados como três módulos unidos em um único polipeptídeo [37]. Os módulos são: biotina carboxilase (BC), proteína carreadora de biotina carboxil (BCCP) e carboxil-transferase (CT). A princípio, a biotina ligada ao BCCP sofre carboxilação catalisada por BC. Em seguida, a biotina carboxilada é translocada por BCCP para o sítio em CT, no qual o acetil-CoA é carboxilado tendo a biotina como doadora do grupo carboxil. [37]. Tanto em *E. coli*, quanto em *Arabidopsis thaliana*, foi observado que GlnB se liga à BCCP e inibe a atividade de ACC. Essa inibição é mediada pelos níveis de 2-OG na célula, sendo que em altas concentrações desse metabólito, a inibição é revertida [38]. Experimentos realizados com *A. thaliana* mutante no gene *AtGLB1*, que codifica para uma proteína do tipo PII, mostraram um aumento na produção de ácidos graxos [39].

Para *H. seropedicae* ainda não está claro qual o papel do sistema Ntr na regulação da atividade de GS. A estirpe mutante no gene *glnB* não teve a atividade de GS afetada, sugerindo que a proteína PII que participa da regulação seria GlnK [40]. Em contrapartida, experimentos realizados com a estirpe mutante no gene *glnK* mostraram que o produto desse gene parece não se relacionar com a regulação da atividade de GS, uma vez que a atividade dessa enzima foi semelhante à estirpe selvagem em todas as condições testadas [41]. Em *Azospirillum brasilense* as proteínas PII também parecem não estar relacionadas com a regulação da atividade de GS [42, 43]. Em *Rhodospirillum rubrum*, apenas proteínas PII não modificadas aparentam ser necessárias para a atividade de GlnE, incentivando a atividade ATase, embora PII-UMP<sub>3</sub> possa competir pelo sítio de ligação em GlnE e inibir a atividade ATase [44].

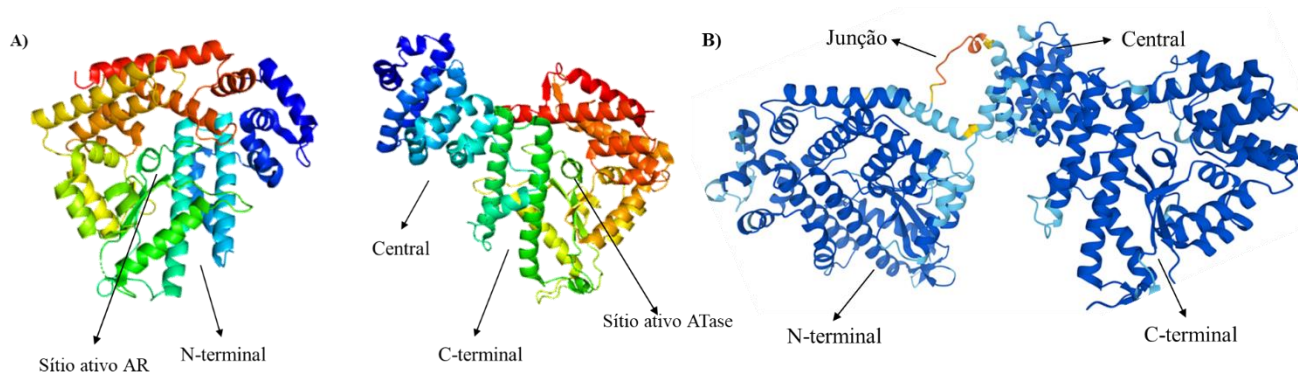
### 1.5. Enzima GlnE

A enzima bifuncional GlnE é produto do gene *glnE* e possui 946 aminoácidos e 104 kDa de massa molecular. A estrutura completa da enzima ainda permanece desconhecida, mas dados experimentais indicam que ela possui três domínios: o N-terminal, o central e o C-terminal. Em *E. coli*, é sugerido que o domínio N-terminal é o responsável pela atividade AR e que o C-terminal desempenha a atividade ATase. É hipotetizado, ainda, que o domínio central é o centro de regulação da enzima, no qual acontecem as interações com a proteína GlnB [45]. Os domínios catalíticos apresentam similaridade de sequências indicando um ancestral comum [46].

Para *E. coli*, o modelo de regulação de GlnE propõe que há dois sítios distintos para interação com GlnB. Esses sítios são localizados entre os domínios central e N-terminal e central e C-terminal. O domínio localizado no lado N-terminal do domínio regulador é o ponto de interação com GlnB não-modificada, cuja ligação estimula a atividade ATase. Além disso, essa atividade requer glutamina, sendo o sítio para ligação de glutamina localizado no domínio C-terminal [23]. Por outro lado, a atividade AR é estimulada pela ligação de PII-UMP<sub>3</sub> no sítio em C-terminal. Essa ligação estimula a atividade do domínio N-terminal, que requer ainda ATP e 2-OG [23]. Em *Rhodospirillum rubrum*, a regulação da atividade de GlnE parece depender apenas de PII não-modificada para a estimulação da atividade ATase, sendo que a atividade AR é constitutiva e não

depende de moduladores alostéricos. Além disso, o sítio de ligação a PII está localizado em N-terminal [44].

Embora a estrutura completa não seja experimentalmente conhecida, as estruturas dos domínios N-terminal e C-terminal da GlnE de *E. coli* foram resolvidas separadamente por cristalografia de raios-X [47, 48]. Mais recentemente, uma previsão da estrutura inteira foi possível pelo algoritmo de inteligência artificial AlphaFold 2.0 e depositada em seu banco de dados (AlphaFold P30870). Embora o modelo previsto tenha grande qualidade, a maior incerteza permanece na estruturação da junção dos domínios N e C-terminal, de forma que o problema estrutural de GlnE permanece (fig. 6).



**Figura 6.** Modelos estruturais de GlnE de *E. coli*. Na figura A são mostradas as estruturas dos domínios N-terminal (direita – PDB 1V4A) e C-terminal (esquerda – PDB 3K7D) resolvidos por cristalografia de difração de raios-X. A figura B mostra a previsão da estrutura completa de GlnE provida pela inteligência artificial AlphaFold.

Anteriormente em nosso laboratório, foi construída uma estirpe de *H. seropedicae* com deleção do gene GlnE [49]. A caracterização inicial dessa estirpe mostrou que a deleção do gene *glnE* prejudica o crescimento da bactéria quando a única fonte de nitrogênio é o nitrato e que a atividade de GS foi aumentada em condições de alto amônio. Esses resultados levaram os autores a propor que a regulação desempenhada por GlnE sobre GS está relacionado com a capacidade da bactéria em metabolizar nitrato. Além, disso, a estirpe mutante apresentou um pequeno aumento na atividade da nitrogenase [49].



## 1.6. Justificativa

A bactéria *H. seropedicae* apresenta grande potencial biotecnológico, sendo empregada como biofertilizante. Esse potencial pode ser otimizado por engenharia genética e metabólica afim de aumentar a fixação de nitrogênio e a excreção de amônio, para ser assimilado pela planta hospedeira. A otimização do processo passa pela inserção de perturbações na rede regulatória do metabolismo de nitrogênio. Como a enzima GlnE é central na regulação da assimilação de amônio, a descrição detalhada dos mecanismos regulatórios dessa enzima é essencial. Porém, por ser uma enzima bifuncional complexa com sítios ativos distintos que catalisam reações em sentidos opostos e com um mecanismo regulatório intrincado, a descrição detalhada da atividade de GlnE pode ser um trabalho bastante laborioso. Dessa forma, a abordagem da caracterização *in vitro* dos domínios truncados utilizada neste trabalho pode ser bastante informativa.

## 1.7. Objetivos

**1.7.1. Objetivo geral:** descrever a regulação da enzima GlnE de *H. seropedicae* a partir de variantes truncadas

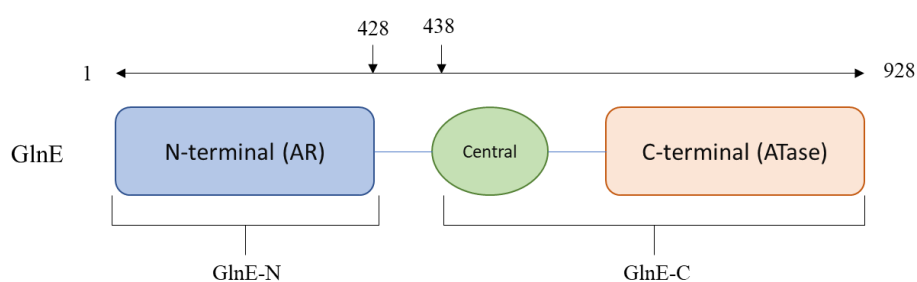
**1.7.2. Objetivos específicos:**

- Caracterizar a atividade regulatória de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> sobre as variantes truncadas GlnE-N e GlnE-C;
- Avaliar a atividade regulatória do ATP, ADP e 2-OG sobre a atividade de GlnE-N, na presença e ausência de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>;
- Verificar a interação proteína-proteína entre GlnE-N e GlnB na presença de ATP, ADP e 2-OG;
- Verificar a atividade regulatória desempenhada pelo 2-OG sobre a atividade de GlnE-C na presença e ausência de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Variantes truncadas

As variantes truncadas de GlnE utilizadas neste trabalho foram construídas anteriormente por Stefanello, A.A. *et al* (dados não publicados). A variante que corresponde ao domínio N-terminal de GlnE será referida como GlnE-N. GlnE-N compreende os aminoácidos 1-428 e possui massa de 48 kDa. A variante aqui referida como GlnE-C compreende os domínios C-terminal e central de GlnE. GlnE-C corresponde aos aminoácidos 438-928 e possui massa molecular de 55 kDa. Um esquema, baseado na GlnE de *E. coli*, das variantes truncadas é mostrado na figura 7.



**Figura 7.** Variantes truncadas GlnE-N e GlnE-C em relação a GlnE-inteira. GlnE-N corresponde ao domínio N-terminal e GlnE-C aos domínios Central e C-terminal.

### 2.2. Bactérias e vetores

Foram utilizadas duas estirpes de *Escherichia coli*: a TOP10 (Invitrogen) foi utilizada para replicação de plasmídeos e a BL21(DE3) (Invitrogen) foi utilizada para a expressão de proteínas. A relação dos vetores utilizados, bem como a aplicação de cada um, está apresentada na tabela 1. Todos os vetores possuem gene de resistência à canamicina e em todas as construções, o gene está sob controle do promotor T7 e do operador *lacI*.

**Tabela 1.** Relação dos vetores de expressão codificantes de GlnE-N, GlnE-C, GS e GlnB

<b>Construção</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>glnE12pET28a</i>	Codifica GlnE-N fusionada a cauda His N-terminal	Stefanello, A.A. <i>et al</i> (não publicado)
<i>glnE36pET28a</i>	Codifica GlnE-C fusionada a cauda His N-terminal	Stefanello, A.A. <i>et al</i> (não publicado)
<i>glnApETM11</i>	Codifica GS fusionada a cauda His N-terminal	Tomazini, L.F. <i>et al</i> (não publicado)
<i>glnBpETM11</i>	Codifica GlnB fusionada a cauda His N-terminal	Tomazini, L.F. <i>et al</i> (não publicado)
<i>glnBpET29</i>	Codifica GlnB nativa	Tomazini, L.F. <i>et al</i> (não publicado)

### 2.3.Meios de cultura para bactérias

As estirpes de *E. coli*, foram cultivadas nos meios líquido Luria-Bertani (LB) e sólido Luria-Bertani Ágar (LA) [50] descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultura LB e LA

<b>Componente</b>	<b>Meio LB (g/L)</b>	<b>Meio LA (g/L)</b>
Extrato de Levedura	5,0	5,0
Cloreto de Sódio	10,0	10,0
Triptona	10,0	10,0
Ágar Bacteriológico	--	15,0

Para obtenção de GS em diferentes estados de modificação pós-traducional, utilizamos o meio mínimo M9 adicionado de 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl (para GS adenilada) e 27 mM de glutamina (para GS não-modificada) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Composição do meio mínimo M9

<b>Solução de Sais M9 5x</b>	<b>C.F.* (mM)</b>	<b>Meio M9</b>	<b>C.F. (mM)</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5	Solução de Sais M9 5x	250
NaCl	2,2	MgSO <sub>4</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	Glicose 20%	85
		CaCl <sub>2</sub>	10

\*C.F.: Concentração Final

## 2.4. Transformação bacteriana por choque térmico

A transformação de células competentes aconteceu pela mistura de 5  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial, que foi mantida em gelo por 30 min. Após esse período, as células foram submetidas a choque térmico por 45 s a 42°C e transferidas imediatamente para o gelo por 2 min. Em seguida foram ressuspensas em 900  $\mu\text{L}$  meio LB e incubadas a 37°C durante 30 min. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 10.800 g por 1 min e plaqueadas em meio LA contendo canamicina (10 mg/mL).

## 2.5. Expressão de proteínas

### 2.5.1. Expressão de GlnE-N, GlnE-C e GlnB

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

### 2.5.2. Expressão de GS em alto e baixo nitrogênio

As células transformadas foram crescidas durante a noite em pré-inóculos de 3 mL de meio LB. Posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  do pré-inóculo foram transferidos para frascos contendo 50 mL de meio M9 e canamicina (10 mg/mL). A condição de alto nitrogênio necessária para formação de GS adenilada foi estabelecida pela adição de 20 mM de amônio ao meio M9. De outra forma, a condição de baixo nitrogênio necessária para a obtenção de GS não-modificada foi estabelecida pela adição de 27 mM de glutamina ao meio M9. As células foram mantidas sob agitação a 37°C até  $\text{DO}_{600}$  em torno de 0,5. A expressão das proteínas foi induzida com 0,5 mM de IPTG (Isopropil-D-tiogalacopiranosídeo) por 4 horas a 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação durante 10 min a 10.800 g e o *pellet* estocado a -20°C até o momento do uso.

## 2.6. Purificação de proteínas

Os *pellets* de células contendo as proteínas superexpressas foram ressuspensos em tampão A (Tris-HCl pH 8,0 50 mM; NaCl 50 mM; Imidazol 20 mM). As células foram lisadas por sonicação durante 5 min, com pulsos e intervalos de 5 s, em banho de gelo. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 10.800 g por 10 min a 4°C.

As proteínas GS, GlnE-N e GlnE-C foram purificadas por cromatografia de afinidade. A fração solúvel foi injetada em coluna de resina HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup>(GE). As proteínas foram eluídas em um gradiente de 20 a 1000 mM de imidazol em tampão B (Tris pH 8,0 50 mM; NaCl 50 mM; Imidazol 1000 mM). A proteína GlnB foi purificada por cromatografia de troca iônica. Nesse caso, foi utilizado o tampão A para troca iônica (NaCl 50 mM. Tris-HCl pH 8,0 50 mM). A fração solúvel foi injetada em uma coluna cromatográfica HiTrap-Heparina. As proteínas foram eluídas por gradiente de 20 a 1000 mM de NaCl em tampão B (NaCl 1000 mM; Tris pH 8,0 50 mM).

Em todos os casos, as frações contendo as proteínas purificadas foram dialisadas em dois passos: primeiro contra tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0 e 50 mM NaCl *overnight*; após, as proteínas foram transferidas para tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de NaCl e 50% de Glicerol por, pelo menos, 12h. As proteínas foram quantificadas por espectrofotometria em Nanodrop (Thermofisher).

## 2.7. Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em sistema vertical com gel de poliacrilamida 12% (m/v). O gel de separação foi composto por Tris pH 8,8 0,3 M; SDS 1%; Acrilamida 12%; APS 0,05% e TEMED e o gel de empilhamento composto por Tris pH 6,8 6 mM; SDS 0,05%; Acrilamida 4%; APS 0,05% e TEMED. As amostras foram misturadas a 5 µL de tampão de amostra (2% de SDS; 10% de Glicerol; 0,01% de Azul de Bromofenol; 0,0625 mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β-mercaptoetanol) e fervidas a 80°C por 5 min para a desnaturação. A corrida eletroforética aconteceu sob uma tensão de 170V. As proteínas dos géis foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

## 2.8. Western-blot

O western-blot foi utilizado para identificar o estado de modificação pós-traducional de GS expressa em alto e baixo amônio. Para isso, 7  $\mu\text{M}$  das proteínas purificadas foram submetidas a SDS-PAGE 12%, corrida a 80V. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese a 100 V por 1h em tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM; Glicina, 39 mM; Metanol 20%). Após a corrida, a membrana foi incubada por 5 min em solução de Panceau-S (0,5%), para verificar a transferência. Em seguida, a membrana foi incubada com 5 mL da solução bloqueio (Albumina 3%; TBS-T 1X (Tris-HCl pH 7,5 100 mM; NaCl 1,5 M; Tween-20 0,05%)) por 1h sob agitação. Depois, a membrana foi incubada por 1h com o anticorpo primário anti-AMP 7C11 [51] diluído 5000 vezes em solução de bloqueio durante a noite, sob agitação à 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBTS-T e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário anti-mouse HRP diluído 5000 vezes e incubada por 1h sob agitação. Para a revelação, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de solução de revelação (Kit Pierce Fast Western Blot – Thermofisher), incubado por 5 min. A detecção de fluorescência e produção das imagens foram feitas no equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Lifesciences).

## 2.9. Uridililação de GlnB *in vitro*

A uridililação *in vitro* de GlnB foi realizada como descrito por Oliveira, M.A.S. e colaboradores (2015 - 52), com modificações. Para a uridililação de 200  $\mu\text{M}$  de GlnB, foi adicionado ao mix de uridililação 66  $\mu\text{L}$  de tampão Mg5x (Tris pH 7,5 500 mM; KCl 500 mM;  $\text{MgCl}_2$  125 mM), 5 mM de 2-OG, 1 mM de UTP; 0,2 mM de ATP e 1 mM de GlnD, gentilmente cedida por Lorena Polizelli. A reação foi incubada a 37°C *overnight*. O progresso da uridililação foi acompanhada por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes. Ao final do processo, GlnD foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 min.

## 2.10. Adenililação de GS *in vitro*

Para a adenililação de GS, 5  $\mu\text{L}$  do mix de adenililação (Tris pH 7,5 5mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM; Soro Albumina Bovino (BSA) 2 mg.mL<sup>-1</sup>; ADP 1 mM; Glutamina 1mM e ATP 1 mM), foram adicionados à GS não-modificada (368 nM) e 104 nM de GlnE-C.

Conforme a necessidade do experimento, foram adicionados 23 nM de GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub>. Para a avaliação da influência de 2-OG, 5 mM desse modulador foi adicionado conforme a necessidade. A reação aconteceu a 37°C por 20 min. Após esse período, procedemos com a reação  $\gamma$ -GT.

### **2.11.Desadenililação de GS *in vitro***

Para a desadenililação de GS, 5  $\mu$ L do mix de desadenililação (Tris pH 7,5 5mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM; Soro Albumina Bovino (BSA) 2 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados à GS modificada (375 nM) e 104 nM de GlnE-N. Conforme a necessidade do experimento, foram adicionados 23 nM de GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub>. Para a avaliação da influência de moduladores alostéricos, foram adicionados 5 mM de ATP, ADP e 2-OG conforme a necessidade. A reação aconteceu a 37°C por 20 min. Após esse período, foi adicionado o mix  $\gamma$ -GT.

### **2.12.Ensaio de atividade $\gamma$ -GT de GS**

Os ensaios de atividade  $\gamma$ -GT de GS foram utilizados para monitorar indiretamente a atividade de GlnE-N e GlnE-C. Essas reações foram realizadas conforme descritas por Bender e colaboradores (1977 – 53) com modificações. Foi adicionado ao mix de adenililação ou de desadenililação 40  $\mu$ L do mix  $\gamma$ -GT (Imidazol pH 6,5 77 mM; Hidroxilamina 11 mM; MnCl<sub>2</sub> 0,17 mM; Arseniato de Potássio 14 mM; ADP 0,23 mM). Para a condição com magnésio foi adicionado MgCl<sub>2</sub> 60 mM. A reação foi iniciada pela adição de 14 mM de Glutamina e aconteceu a 37°C por 60 min. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de *Stop Mix* (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,04 M, TCA 0,12 M e HCl 0,61 M). O produto da reação,  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato, foi quantificado por espectrofotometria a 490 nm.

### **2.13.Ensaio de atividade biossintética de GS**

A atividade biossintética foi utilizada para monitorar a influência de 2-OG sobre GS adenililada e não-modificada. Para isso, 40  $\mu$ L de mix reacional (Imidazol pH 7,2 57 mM; Hidroxilamina 28 mM; MgCl<sub>2</sub> 34 mM ou MnCl<sub>2</sub> 34 mM; Glutamato 97 mM) foi adicionado à 20  $\mu$ L de água contendo GS (368 nM) ou GS-AMP (375 nM). Nas condições

com 2-OG foram adicionados 5 mM dessa molécula. A reação foi disparada pela adição de 14 mM de ATP e aconteceu a 37°C por 60 min. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de *Stop mix*. O produto da reação foi quantificado por espectrofotometria a 490 nm.

#### 2.14. Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF)

Os experimentos de DSF foram realizados conforme descrito por Niesen, F.H. *et al* (2007 - 54) com modificações. Cada reação de interação proteína ligante continha: 30 uM de GlnE-N; 9 µL de tampão 5x (Hepes 500 mM; NaCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 125 mM) e 5 mM de SYPRO Orange (ThermoFisher). Para os experimentos de ligação de ATP e ADP, foram acrescentados 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 0,7 mM; 1 mM; 1,5 mM e 2 mM de cada nucleotídeo, conforme a necessidade do experimento. Para os testes de razão ATP/ADP e ADP/ATP, GlnE-N foi saturada com 5 mM de ligante por 5 min. Em todos os casos, foi adicionado água para um volume final de 20 µL.

As reações foram executadas no termociclador de RT-PCR StepOne (Applied Biosystems), na faixa de temperatura de 25 a 94°C, variando 1°C por minuto. Os espectros de emissão de fluorescência foram gerados pelo software StepOne v2.3 e expressos como a recíproca da primeira derivada da fluorescência pela temperatura (-dF/dT). Os picos gerados representam os valores das temperaturas de *melting* (T<sub>M</sub>), ou seja, a temperatura na qual 50% de uma população de proteínas está desnaturada.

Após a obtenção dos valores das temperaturas de *melting*, nós calculamos a variação das T<sub>M</sub> (ΔT<sub>M</sub>) entre a condição com o ligante e o controle sem ligante. Esses valores de ΔT<sub>M</sub> foram ajustados a um modelo de regressão não-linear (equação 1) para a determinação dos valores de K<sub>D</sub> aparentes [55].

$$T_m(L) = T_{m_0} + ((T_{m_1} - T_{m_0}) \left(1 - \left(\frac{([P] - K_d - [L]) + \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4[L][P]}}{2[P]}\right)\right))$$

**Equação 1.** Equação quadrática para determinação dos valores de K<sub>D</sub> aparente. T<sub>m</sub>(L) é temperatura de *melting* em função da concentração de ligante; T<sub>m0</sub> é a temperatura de *melting* na ausência de ligante; T<sub>m1</sub> é o maior valor da temperatura de *melting*, P é concentração de proteína; K<sub>D</sub> é a constante de dissociação; L é a concentração de ligante. P, L e K<sub>D</sub> são expressos em mM.



### **2.15. Ensaio de co-precipitação (*Pull-down*)**

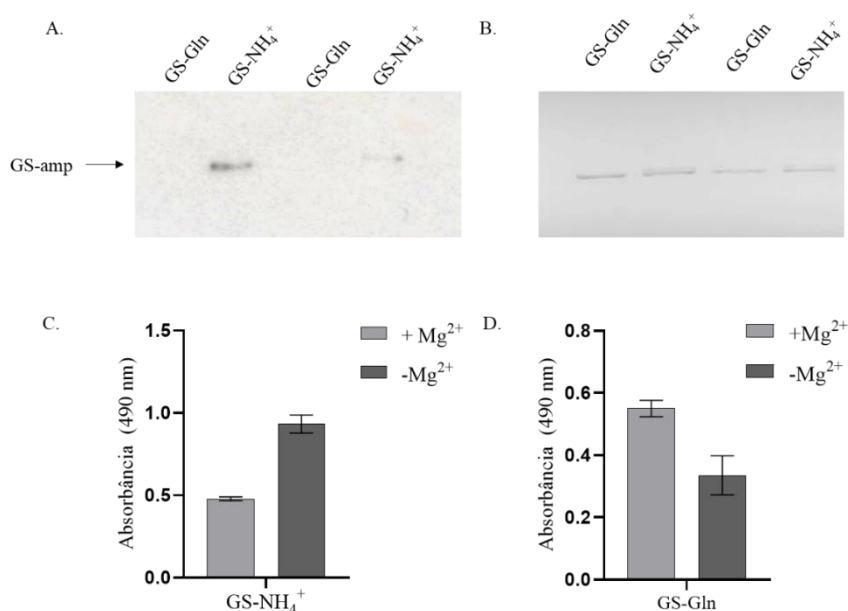
Os ensaios de co-precipitação foram realizados para demonstrar a interação entre GlnB e GlnE-N. Para isso, 7 nM de GlnE-N (com cauda His), 30 nM de GlnB e 1 mM de efetores foram incubados com 3  $\mu$ L de resina magnética (HisPur – Ni-NTA-Thermofischer) em tampão de interação (Hepes 20 mM; NaCl 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; DTT 1 mM), para um volume final de 50  $\mu$ L. A interação prosseguiu por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período, o sistema foi precipitado em rack magnética. O sobrenadante foi separado e ao precipitado foi adicionado 50  $\mu$ L de tampão de interação contendo efetores. Novamente, o sistema foi precipitado em rack magnética e o sobrenadante separado. Esse processo foi repetido 4 vezes. Ao final, a resina foi misturada a 5  $\mu$ L de tampão de amostra para a corrida de SDS-PAGE 14%.

### 3.Resultados

#### 3.1.Determinação do estado de modificação pós-traducional de GS expressa em condições de alto e baixo nitrogênio

Para determinar o estado de modificação pós-traducional das enzimas glutamina sintetase (GS) expressas em condições de alto (20 mM de amônio) e baixo nitrogênio (27 mM de glutamina), nós realizamos western-blot utilizando anticorpo anti-AMP. Nós observamos bandas referentes à GS-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, indicando que as enzimas expressas na condição de alto amônio estavam no estado adenililado (fig.8a). De maneira oposta, não detectamos bandas referentes à GS-Gln, expressa em condição glutamina, indicando o estado não modificado de GS (fig.8a). A imagem B da figura 8 apresenta um SDS-PAGE corado com coomassie-blue que foi usado como controle do western-blot, mostrando que foram aplicadas quantidades equivalentes em volume de GS-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e GS-Gln.

Nós também verificamos o estado de modificação de GS pela sua atividade  $\gamma$ -glutamyl-transferase ( $\gamma$ -GT). Aproximadamente 50% da atividade de GS-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi inibida por magnésio, indicando o estado parcialmente adenililado dessa enzima (Fig. 8). Por outro lado, a atividade de GS-Gln foi, aproximadamente, 35% menor na condição sem magnésio, indicando o estado não-adenililado (Fig. 8).



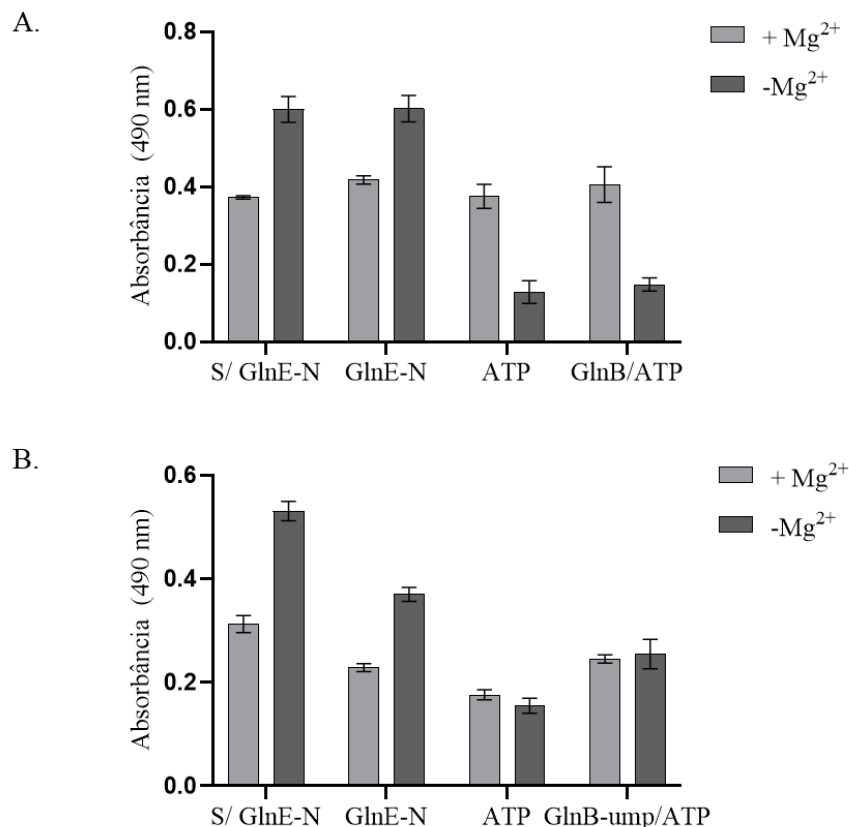
**Figura 8.** Determinação do estado de modificação pós-traducional de GS. A) Western-blot com anticorpo anti-AMP mostrando que GS expressa em meio contendo 20 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> estava no estado adenililado, enquanto que a GS expressa em meio contendo 27 mM de glutamina estava no estado não-modificado. B) SDS-PAGE controle do Western-blot, mostrando que foram aplicados volumes equivalentes de GS no Western-blot; C e D) atividade  $\gamma$ -GT de GS, indicando que GS-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> estava adenililada (c) e GS-Gln não-modificada (d).

### 3.2. Regulação da atividade AR de GlnE

Em *E. coli*, é descrito que a atividade adenilil-removedora (AR) de GlnE é desempenhada pelo domínio N-terminal dessa enzima, a qual é estimulada pela proteína GlnB em seu estado uridililado (GlnB-UMP<sub>3</sub>) quando na presença de ATP e 2-OG. Em *R. rubrum* a atividade AR é independente de GlnB-UMP<sub>3</sub> e efetores. Dessa forma, para verificar os processos regulatórios sobre a atividade AR da GlnE de *H. seropedicae*, nós realizamos ensaios de atividade  $\gamma$ -GT de GS, na presença do domínio N-terminal isolado (GlnE-N) e na presença de GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub>. Como, além do estado de modificação pós-traducional, a interação de GlnB com suas proteínas-alvo é regulada alostericamente por ATP, ADP e 2-OG, os ensaios de desadenililação foram conduzidos na presença dessas moléculas.

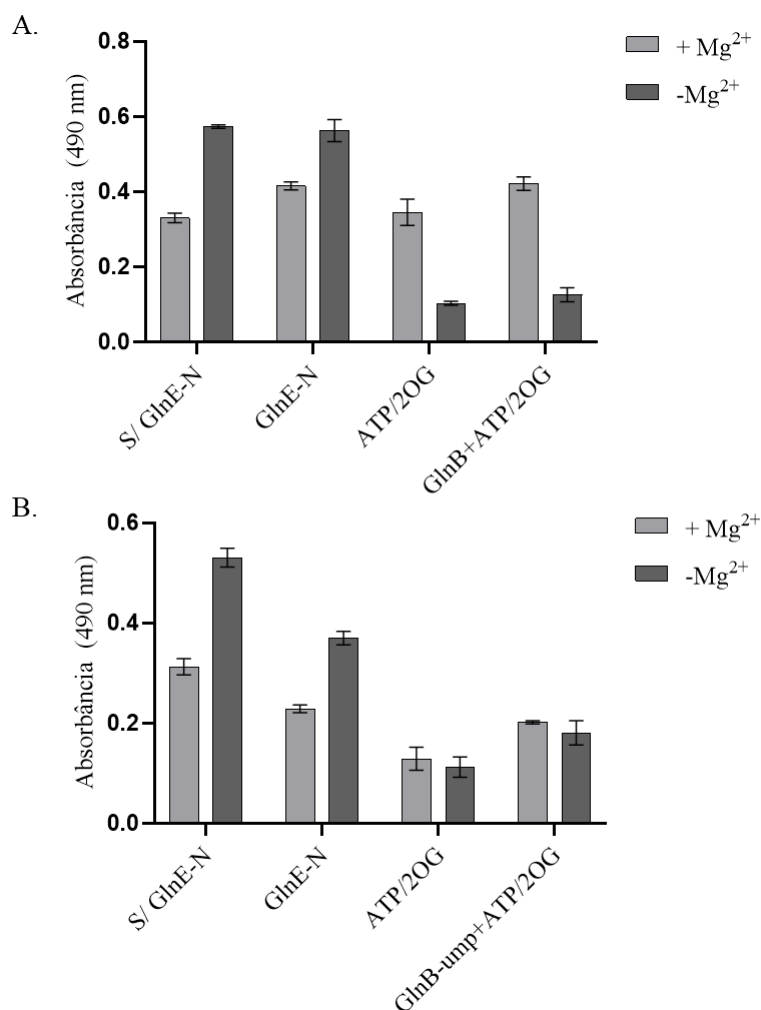
Na condição com ATP a atividade de GS, na ausência de magnésio, teve uma redução de 79% sem GlnB e de 76% quando havia GlnB, em relação ao controle (Fig. 9, A). A redução da atividade de GS na ausência de magnésio sugere a transição do estado adenililado para o não-adenililado tanto na presença quanto na ausência de GlnB, sugerindo que essa proteína não influencia a atividade AR por interação direta com o domínio N-terminal modulada por ATP.

De forma semelhante, em relação ao controle, a atividade de GS foi reduzida em cerca de 53% na presença de GlnB-UMP<sub>3</sub> na condição com ATP mostrando a transição de estados de modificação de GS. Entretanto, a atividade sem a presença de GlnB modificada teve uma queda de aproximadamente 71%, indicando GlnB-UMP<sub>3</sub> não estimula a atividade AR da GlnE de *H. seropedicae* por interação direta com o domínio N-terminal na presença de ATP (Fig. 9, B).



**Figura 9.** Atividade de GlnE-N na condição com 5 mM de ATP. GlnB (a) e GlnB-UMP<sub>3</sub> (b) não apresentaram atividades regulatórias sobre a atividade de GlnE-N. Em todos os casos GS foi desadenilada

O 2-OG é um modulador alostérico que apenas pode se ligar à GlnB quando ATP está presente, visto que o ATP estabelece a coordenação necessária para a interação. Nesse caso, nós verificamos o efeito da presença de 2-OG sobre a regulação da atividade AR por GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> com ensaios contendo ATP e 2-OG. Os resultados encontrados mostram diferença no perfil de inibição de GS por magnésio, indicando a desadenilação. A atividade sem magnésio teve uma queda de 83% na ausência de GlnB e de 79% quando a proteína estava presente (Fig. 10, A). A atividade de GS na presença de GlnB-UMP<sub>3</sub> na condição ATP/2-OG foi diminuída em 67% na ausência de magnésio em relação ao controle. No mesmo experimento, a redução da atividade de GS na ausência de GlnB-UMP<sub>3</sub> foi de 78%, sugerindo que não há efeito regulatório dessa proteína sobre atividade AR por interação com N-terminal na presença de 2-OG (Fig. 10, B).

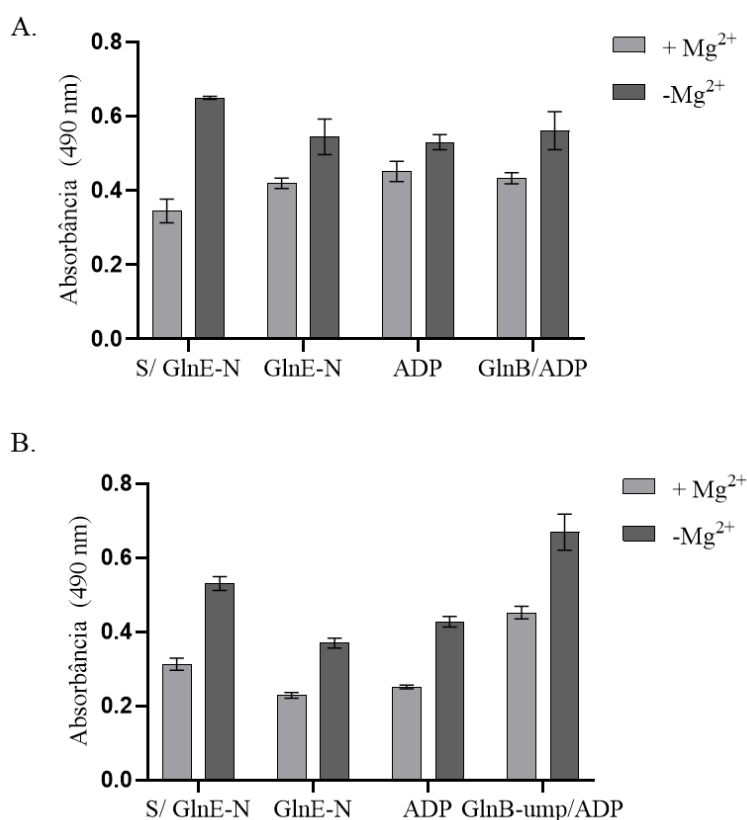


**Figura 10.** Atividade de GlnE-N na condição com 5 mM de ATP e 5 mM de 2-OG. GlnB (a) e GlnB-Ump<sub>3</sub> (b) não apresentaram atividades regulatórias sobre a atividade de GlnE-N. Em todos os casos GS foi desadenilada.

Por fim, nós testamos a regulação da atividade AR por GlnB e GlnB-Ump<sub>3</sub> na presença de ADP. Ao contrário dos experimentos anteriores, nós não observamos alteração no perfil de inibição de GS. No experimento com GlnB não-modificada, nós observamos uma redução de apenas 14% na atividade de GS na presença de GlnB e de 19% quando GlnB estava ausente. Esse resultado sugere que, além de não haver efeito regulatório de GlnB, a atividade AR de GlnE não é estimulada na presença de ADP (Fig. 11, A).

Quando o experimento foi realizado com GlnB-Ump<sub>3</sub>, a atividade de GS teve um incremento de cerca de 20% em relação ao controle, enquanto na ausência da proteína foi observado um decréscimo de 20%. Em ambos os casos o perfil de inibição de GS foi

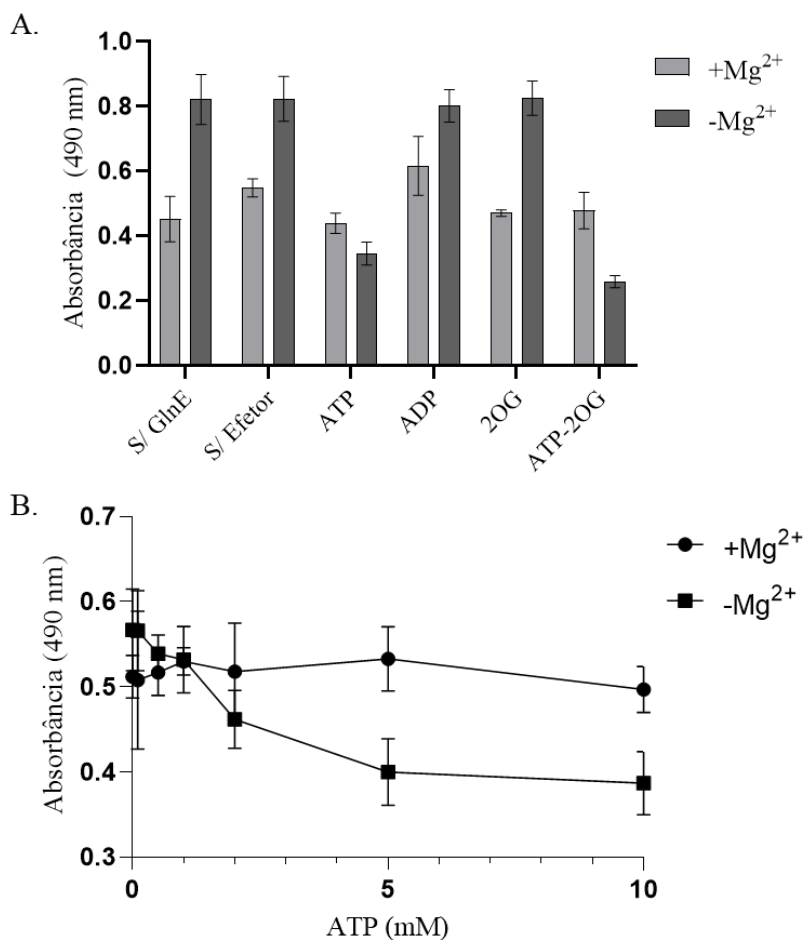
semelhante, indicando o estado adenilado, sugerindo que GlnB-UMP<sub>3</sub> não apresenta atividade regulatória na presença de ADP (Fig. 11, B).



**Figura 11.** Atividade de GlnE-N na condição com 5 mM de ADP. de 2-OG. GlnB (a) e GlnB-UMP<sub>3</sub> (b) não apresentaram atividades regulatórias sobre a atividade de GlnE-N. Em todos os casos GS não foi desadenilada.

Em conjunto, os resultados das figuras 9, 10 e 11 sugerem que GlnB não participa da regulação da atividade AR, independentemente do seu estado de modificação pós-traducional, por interação direta com o domínio N-terminal. Além disso, os resultados mostraram que atividade AR foi estimulada apenas nas condições com a presença de ATP. Para verificar a dependência de ATP na atividade AR, nós reunimos em um mesmo experimento ATP, ADP e 2-OG, na ausência de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> (Fig. 12, A). Novamente, a atividade AR foi estimulada somente em condições em que havia ATP. Por outro lado, a condição com 2-OG não apresentou alteração no perfil de inibição de GS característico de desadenilação, sugerindo que a desadenilação observada nas condições ATP/2-OG é consequência direta da presença de ATP.

A dose-dependência de ATP para a atividade AR é mostrada na figura 12, B, onde observamos o aumento da desadenililação de GS conforme há incremento na concentração de ATP.



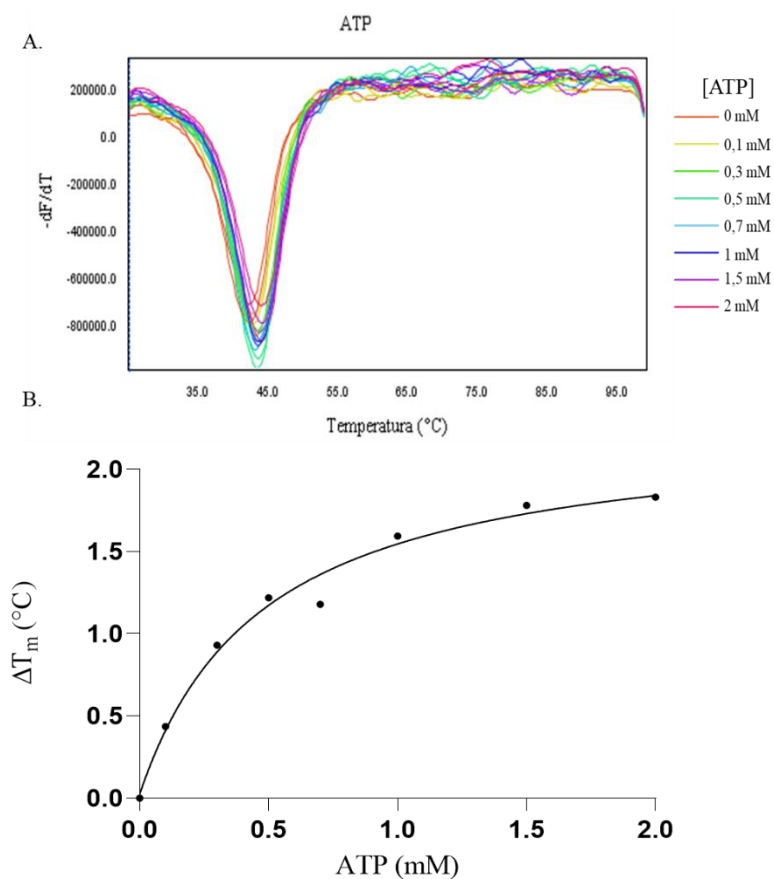
**Figura 12.** Regulação de GlnE-N por moduladores alostéricos. A figura A mostra que GlnE-N foi ativada nas condições com ATP e ATP+2-OG, com 5 mM de cada efetor. A figura B mostra a dose-dependência de ATP na atividade de GlnE-N. As concentrações de ATP usadas foram: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM e 10 mM.

### 3.3. Caracterização da interação de GlnE-N com ATP e ADP

A atividade AR foi estimulada pelo ATP, mas não por ADP, sugerindo uma dependência de condições energéticas para a desadenililação de GS. Nesse caso, GlnE-N deveria possuir sítios de sensibilidade à razão ATP/ADP. Para testar essa hipótese e demonstrar a interação física proteína-ligante de ATP e ADP em GlnE-N, nós realizamos experimentos de Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF), que utiliza fluorescência extrínseca (proporcionada por Sypro Orange) para monitorar a estabilidade térmica de

uma proteína. O aumento da estabilidade térmica é expresso pelo incremento na variação da temperatura de *melting* ( $\Delta T_M$ ).

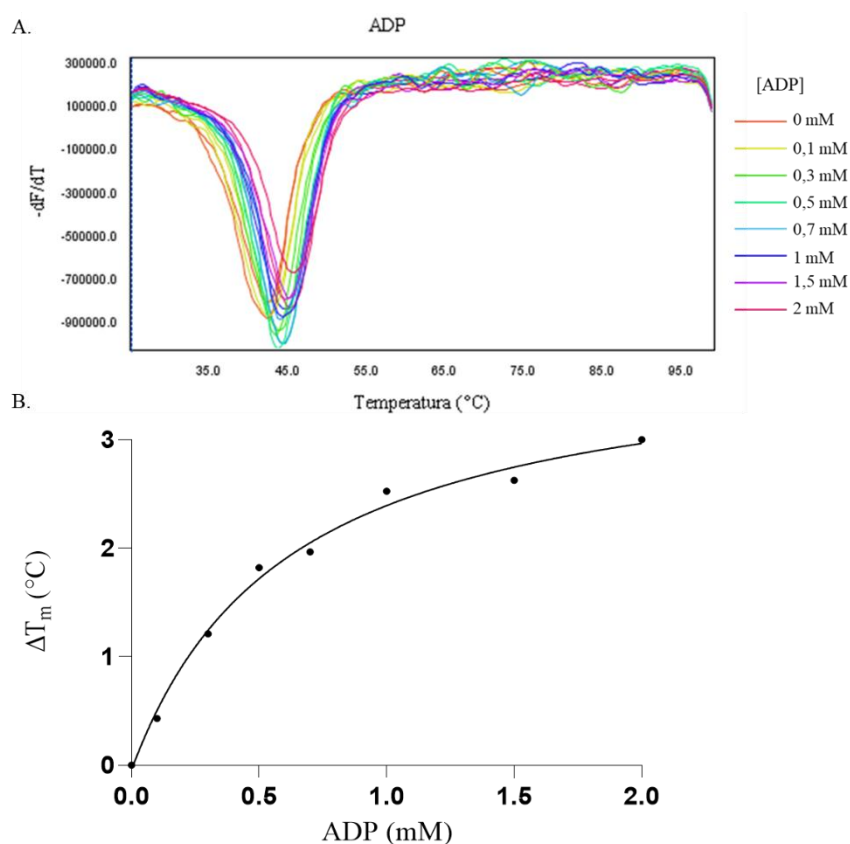
Na figura 13 A, podemos verificar o deslocamento da  $T_M$  em função do aumento da concentração de ATP, mostrando que a presença dessa molécula GlnE-N é mais resistente à desnaturação por calor. Os valores de  $\Delta T_M$  encontrados para GlnE-N na presença de ATP são mostrados na figura 13, B. O formato hiperbólico da curva indica que os valores de  $T_M$  aumentam acentuadamente quando as concentrações de ATP são inferiores a 1 mM. Acima de 1 mM, os valores de  $T_M$  passam a aumentar discretamente. Essas observações sugerem a ligação de ATP à GlnE-N. A partir do ajuste não-linear mostrado na figura 13, B nós determinamos um valor de 0,47 mM para o  $K_d$  aparente da ligação de ATP.



**Figura 13.** DSF da interação de GlnE-N com ATP. A ligação de ATP gera estabilidade térmica de GlnE-N (A). Em concentrações superiores a 1 mM de ATP, GlnE-N tende à saturação. O  $K_d$  determinado foi de 0,47 mM.



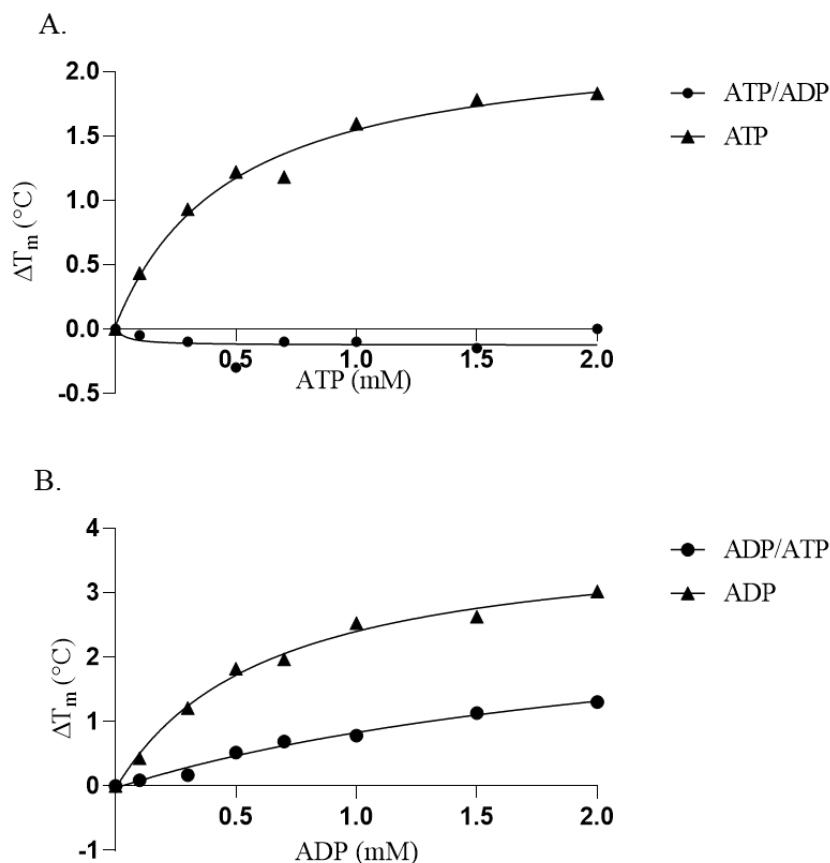
Da mesma forma, o aumento da concentração de ADP também levou ao aumento da estabilidade térmica de GlnE-N (Fig. 14, A), sugerindo a interação desse nucleotídeo com a proteína. A análise da  $\Delta T_M$  em função do aumento da concentração de ADP (Fig. 14, B) indica que a saturação de GlnE-N por ADP tende a iniciar acima de 1 mM. Além disso, para a ligação do ADP nós observamos maiores valores de  $\Delta T_M$  em comparação com os encontrados no experimento de ligação do ATP. Enquanto a ligação do ATP gerou uma  $\Delta T_M$  máxima de 1,83°C, o valor máximo encontrada para a ligação de ADP foi de 3°C. Essa diferença observada entre a  $\Delta T_M$  reflete uma maior estabilidade térmica conferida por esse nucleotídeo à GlnE-N. Nós encontramos um valor de 0,61 mM para o  $K_d$  aparente da ligação de ADP.



**Figura 14.** DSF da interação de GlnE-N com ATP. A ligação de ADP gera estabilidade térmica de GlnE-N (A). Em concentrações superiores a 1,5 mM de ADP, GlnE-N tende à saturação. O valor de  $K_d$  determinado foi de 0,67 mM.

O ADP é um produto formado na reação de fosforólise catalisada por GlnE na atividade AR, de forma que o sítio ativo da enzima tem afinidade por ADP. Assim, nós testamos se GlnE-N é capaz de ligar ADP em um sítio diferente do sítio ativo, implicando

a existência de um sítio regulatório sensível a ADP. Para isso foram realizados experimentos de ligação de ATP e ADP à enzima saturada por 5 mM do ligante oposto, ou seja, as razões ATP/ADP e ADP/ATP. As curvas de saturação das razões foram comparadas com as dos ligantes individuais (Fig. 15).



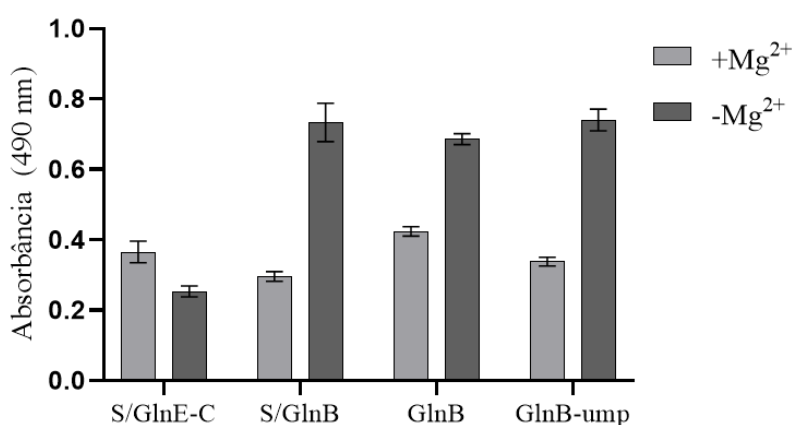
**Figura 15.** Curvas de saturação das razões ATP/ADP (A) e ADP/ATP (B). Quando saturada por 5 mM de ADP, GlnE-N não pode ligar ATP (A), por outro lado, quando saturado por 5 mM de ATP, ainda é detectada a ligação de ADP, sugerindo a existência de dois sítios capazes de ligar ADP. Um sítio é o ativo e o segundo é regulatório, ao qual há competição pela ligação entre ATP e ADP.

A ligação de ATP quando a enzima foi saturada por ADP foi completamente abolida, sendo esse resultado indicado pela perda completa do padrão hiperbólico da curva de saturação, característica da interação proteína-ligante, na condição ATP/ADP. Esse resultado sugere que o ADP bloqueia a ligação de ATP (Fig. 15, A). Por outro lado, não observamos a perda completa da interação do ADP quando a enzima estava saturada por ATP, indicando que o ATP não bloqueia a interação do ADP com enzima (Fig. 15, B).

### 3.4.Regulação da atividade ATase de GlnE por GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>

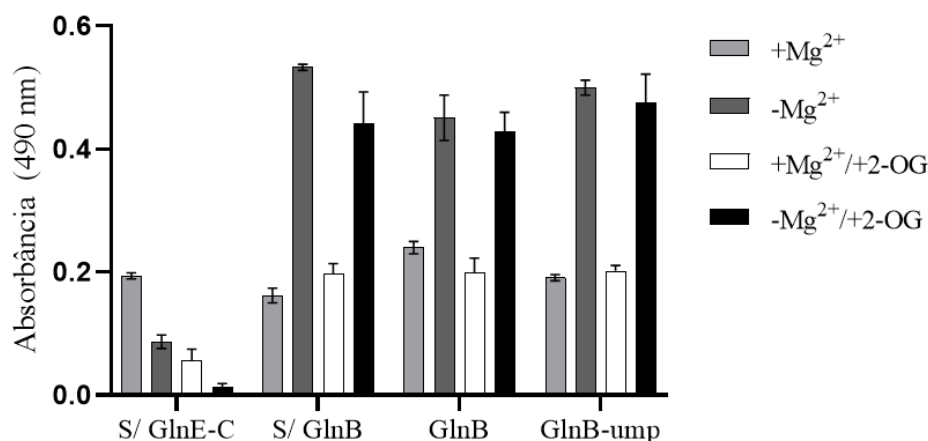
A enzima GlnE catalisa a adenililação de GS a partir de sua atividade ATase desempenhada pelo domínio C-terminal. Em *E. coli* essa atividade é estimulada positivamente por GlnB no estado não-modificado. O mesmo é encontrado em *R. rubrum*, no qual a atividade ATase é diminuída na presença de 2-OG. Para verificar a influência de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> na atividade ATase por interação direta com o domínio C-terminal, nós realizamos ensaios de adenililação de GS utilizando uma versão truncada de GlnE-C. A adenililação de GS foi monitorada pela variação do perfil de inibição de sua atividade  $\gamma$ -GT por íons magnésio. Nesse caso, a versão adenililada de GS tem sua atividade aumentada na condição sem magnésio.

Conforme evidenciado no gráfico da figura 16, a atividade de GS teve um aumento de cerca de 2,7 vezes na presença de GlnB, em relação ao controle sem GlnE-C. Também foi verificado o aumento na condição com GlnB-UMP<sub>3</sub> (2,9 vezes) e na ausência de GlnB (2,8 vezes). Esse experimento sugere que GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub> não exercem atividade regulatória sobre a atividade ATase por interação direta com o domínio C-terminal.



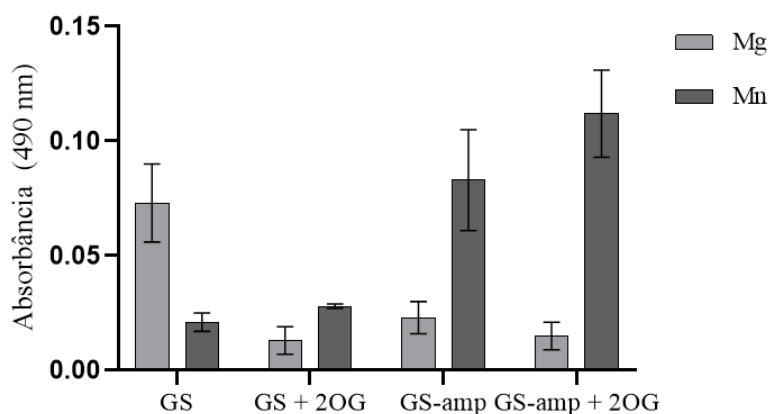
**Figura 16.** Atividade de GlnE-C na presença de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>. Em todas as condições GS foi adenililada, indicando que GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub> não tiveram influência sobre a atividade ATase.

Nós testamos se o 2-OG teria efeito sobre a atividade ATase na presença de GlnB como encontrado em *R. rubrum* [44]. Conforme mostrado na figura 17, nós não observamos diferenças significativas no padrão de adenililação na presença de GlnB, GlnB-UMP<sub>3</sub> e na ausência dessa proteína. Em todos os casos, a atividade ATase foi observada.



**Figura 17.** Atividade de GlnE-C na presença de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> com e sem 2-OG. Em todas as condições GS foi adenilada, indicando que GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub> não tiveram influência sobre a atividade ATase quando 2-OG estava presente. Além disso, o 2-OG parece não influenciar a atividade na ausência de GlnB.

Interessantemente, a atividade  $\gamma$ -GT de GS na condição sem GlnE-C foi inibida na presença de 2-OG (fig. 17). A atividade na ausência de magnésio foi cerca de 6,6 vezes menor. Entretanto, na presença de GlnE-C a atividade de GS aumentou 33,9 vezes na condição sem magnésio na presença de 2-OG. Esse resultado sugere a perda do efeito inibitório sobre a atividade  $\gamma$ -GT de GS no estado adenilado. Dessa forma, nós testamos se o 2-OG teria algum efeito alostérico em GS em função de seu estado de modificação pós-traducional a partir de medidas da atividade biossintética da enzima, na qual GS adenilada tem maior atividade quando metal é o manganês, enquanto que a enzima não-modificada é mais ativa na presença de magnésio. O resultado é mostrado na figura 18.

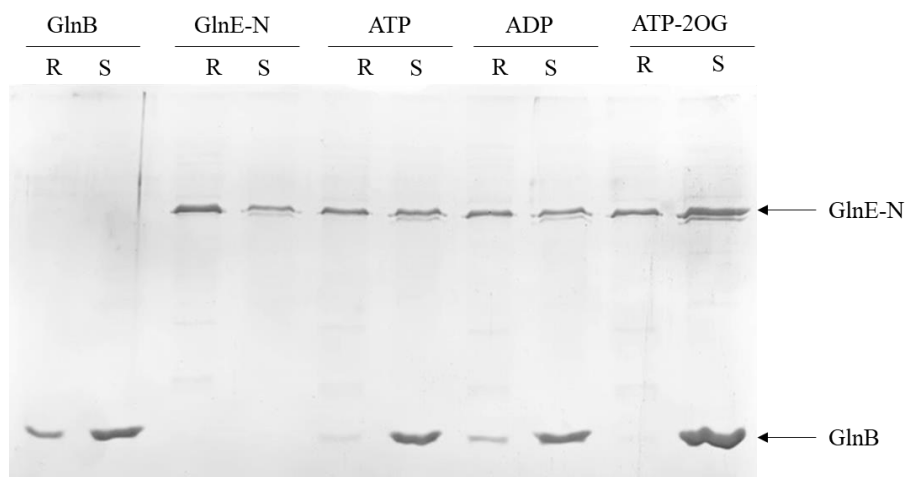


**Figura 18.** Atividade biossintética de GS e GS-AMP na presença de 2-OG. Os resultados sugerem que GS no estado não modificado sofre inibição por 2-OG, mas que essa inibição é perdida quando GS está adenilada.

Os resultados mostram a redução na atividade biossintética da GS não-modificada. A atividade na presença de magnésio sofreu uma queda de cerca de 3,4 vezes. Nas outras condições, não é observado influência significativa na atividade de GS. Esse resultado sugere que o 2-OG pode ser um modulador alostérico negativo de GS no estado não-modificado. Pelo nosso conhecimento, essa é a primeira vez que um efeito regulatório de 2-OG diretamente sobre GS é descrito.

### 3.5. Caracterização da interação entre GlnE-N e GlnB

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram que a atividade ATase de GlnE inteira é maximizada na presença de GlnB e que esse efeito é diminuído quando adicionado 2-OG ao mix reacional [56], semelhante ao observado em *R. rubrum*. Entretanto, os resultados dos ensaios de atividade da variante GlnE-C sugerem que GlnB/GlnB-UMP<sub>3</sub> não participa da regulação da atividade ATase por interação direta com esse domínio. Dessa forma, nós realizamos um ensaio de co-precipitação para avaliar a possível interação de GlnB com o domínio N-terminal de GlnE. O resultado é mostrado na figura 19.



**Figura 19.** Ensaio de co-precipitação mostrando a interação de GlnB com GlnE-N. NA condição com ADP, a banda relativa à GlnB é mais intensa na fração contendo a resina (R), indicando interação nessa condição. Por outro lado, não observamos bandas na condição ATP-2-OG, mostrando que nessa condição não há interação de GlnE-N com a GlnB.

Como pode ser observado na figura 19, na ausência de GlnE-N, GlnB apresenta certa afinidade natural pela resina magnética, sendo que essa característica representa uma dificuldade na interpretação dos resultados do experimento. Entretanto, quando há a

presença de GlnE-N, a intensidade das bandas relativas à GlnB na condição com a resina (R), ou seja, precipitada junto com GlnE, varia de acordo com o efetor que está presente. Nós encontramos uma banda mais intensa na presença de ADP e de menor intensidade na condição com ATP. Nós não observamos bandas referentes à interação GlnB:GlnE-N na condição com 2-OG.

#### 4. Discussão

A via da enzima Glutamina Sintetase (GS) é central no metabolismo de nitrogênio das bactérias, pois a glutamina sintetizada por GS participa como doadora de grupos amino em diversos processos metabólicos. Dada a multiplicidade de processos que são dependentes de glutamina e da dependência de ATP para sua síntese, o fluxo metabólico através de GS é fortemente regulado por modulação alostérica e por modificação pós-traducional. Os metabólitos exercem uma regulação alostérica com efeito cumulativo, que é intensificado pela regulação pós-traducional, uma adenililação reversível, catalisada pela enzima bifuncional GlnE [20]. Uma atividade de GS muito baixa poderia levar a uma diminuição no *pool* intracelular de glutamina e glutamato, com consequências para o anabolismo bacteriano. Por outro lado, uma atividade exagerada de GS pode levar ao acúmulo de glutamina e desperdício de ATP, consumido pela atividade enzimática. O controle fino da atividade de GS através desses mecanismos garante a homeostase energética e da concentração intracelular das moléculas doadoras de grupos amino na célula. De fato, em *E. coli*, as concentrações intracelulares de glutamina e glutamato e a razão ATP/ADP variam pouco, independentemente da disponibilidade de nitrogênio no ambiente [57].

Em *E. coli*, a enzima GlnE é regulada pela proteína de transdução de sinal GlnB. A regulação desempenhada por GlnB depende essencialmente do seu estado de modificação pós-traducional, sendo que a sua forma uridililada (GlnB-UMP<sub>3</sub>) estimula a atividade adenilil-removedora (AR) de GlnE, enquanto que a forma não-modificada estimula a atividade adenilil-transferase (ATase). Os experimentos realizados em *E. coli* ainda mostraram que a atividade AR depende de 2-OG e ATP e que a atividade ATase necessita de glutamina [23]. Por outro lado, a regulação de GlnE em *R. rubrum* parece depender apenas de GlnB no estado não-modificado, para a ativação da atividade ATase. Nesse organismo, a atividade ATase não depende de glutamina e é inibida por 2-OG, enquanto que a AR é constitutiva e não depende de efetores [44].

Nos nossos experimentos realizados com a versão truncada GlnE-N de *H. seropedicae*, a redução na atividade de GS na condição sem magnésio é um indicativo da transição do estado adenililado para o desadenililado, mostrando que essa variante possui atividade AR. Esse perfil de desadenililação de GS foi observado nas condições com ATP e ATP/2-OG (Fig. 9 e 10), mas não foi encontrado na condição com ADP (Fig. 11). Quando a atividade de GlnE-N foi testada com 2-OG sem a presença de ATP, não foi

observado desadenililação de GS, sugerindo que o ATP é o responsável pela estimulação observada na condição ATP/2-OG (Fig.12). O mesmo padrão foi observado em experimentos realizados com uma versão completa de GlnE [56]. Em conjunto, esses resultados sugerem a independência de 2-OG na estimulação da atividade AR e a existência de um sítio regulatório sensível à ATP no domínio N-terminal da GlnE de *H. seropedicae*.

Para verificar se o domínio N-terminal teria um sítio sensível a ATP, nós realizamos experimentos de DSF. Os resultados mostraram um aumento da  $\Delta T_M$  na presença de ATP, sugerindo que esse nucleotídeo aumenta a estabilidade térmica da enzima por se ligar a ela (Fig. 13). Da mesma forma, os resultados de DSF indicam a ligação de ADP em GlnE-N (Fig. 14). A ligação de ADP gerou maiores valores de  $\Delta T_M$  em relação aos encontrados para a ligação de ATP, sugerindo uma maior estabilização de GlnE-N na presença desse nucleotídeo. Esse resultado poderia indicar que GlnE-N possui maior afinidade por ADP. Entretanto, em condições saturantes de ATP, GlnE-N ainda é capaz de ligar ADP em baixas concentrações, sugerindo a existência de mais de um sítio capaz de interagir com ADP (Fig. 15). Como o ADP é produto da reação de fosforólise da atividade AR, a maior estabilização encontrada na ausência de ATP pode ser explicada pela ligação de ADP ao sítio ativo e ao sítio regulatório simultaneamente. Por outro lado, a saturação por ADP aboliu a ligação de ATP (Fig. 15), indicando que ATP e ADP competem pela ligação ao mesmo sítio, que atua como um sensor de energia.

Ao ajustarmos dos valores das  $\Delta T_M$  à equação 1 obtemos uma curva de saturação hiperbólica característica de interação proteína-ligante, tanto para a ligação de ATP quanto para de ADP. O comportamento das curvas é distinto em termos de inclinação, mostrando que GlnE-N se torna saturada pelo ligante mais rapidamente na presença de ATP (Fig. 13). O ajuste dos valores de  $\Delta T_M$  à equação 1 também permitiu determinar um valor de 0,47 mM para o  $K_d$  aparente da ligação de ATP e 0,61 mM para a ligação de ADP. É importante considerar que o  $K_d$  aparente para ADP é influenciado também pela ligação desse nucleotídeo ao sítio ativo, embora a afinidade dessa interação tenda a ser pequena visto que o ADP é produto da reação.

Interpretando o  $K_d$  como a concentração de ligante na qual 50% da enzima está saturada, podemos esperar que a enzima tenda à saturação em concentrações maiores que 0,97 mM de ATP. Esse resultado é consistente com o encontrado no experimento de



atividade de GlnE-N em função da concentração de ATP, no qual há perda da linearidade na atividade da enzima em concentrações maiores que 1 mM (Fig.12).

Considerando que em células de *E. coli* crescidas em baixo nitrogênio a concentração de ATP intracelular é próxima de 2 mM [32] GlnE teria atividade AR máxima nas condições limitantes de nitrogênio nas quais é necessária a atividade de GS, dado que o Km dessa enzima para  $\text{NH}_4^+$  é menor do que o da enzima GDH [15]. Embora o Kd aparente do ADP seja influenciado pela ligação ao sítio ativo, é plausível supor que nas condições limitantes de nitrogênio não há interação de ADP com o sítio regulatório, visto que as concentrações intracelulares de ADP nessa condição são próximas de 0,3 mM [32].

Nos experimentos de atividade AR na presença das proteínas GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>, foi observada a desadenililação de GS nas condições em que havia ATP, independentemente da presença de GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub>, sugerindo que essas proteínas não regulam a atividade AR por interação direta com o domínio N-terminal nessa condição (Fig. 9, 10 e 11). Experimentos realizados com a GlnE inteira também mostraram que a presença de GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub> na condição com ATP, não influencia na atividade AR [56].

Dessa forma, é possível concluir que a estimulação da atividade AR é independente de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>, divergindo do modelo de regulação de *E. coli*, no qual GlnB-UMP<sub>3</sub> é necessário. Em *R. rubrum* AR também é independente de GlnB-UMP<sub>3</sub>, supondo a existência de um mecanismo de regulação homólogo em *H. seropedicae*. Entretanto, *R. rubrum* aparenta não depender de moduladores alostéricos, diferentemente dos nossos resultados encontrados para *H. seropedicae*, no qual o ATP é um fator limitante para a atividade AR. A dependência de ATP aproxima a regulação da atividade AR da encontrada em *E. coli*, a qual é estimulada por ATP, mas diverge pela independência de 2-OG, uma vez que nossos resultados sugerem que essa molécula não tem qualquer efeito sobre a atividade AR (Fig. 12). Nesse sentido, o mecanismo encontrado em *H. seropedicae* para ativação da atividade AR é, em nosso conhecimento, único dentre os descritos até o momento.

Apesar de divergirem quanto a regulação da atividade AR, os modelos de *E. coli* e *R. rubrum* convergem em termos da dependência de GlnB não-uridililada na regulação da atividade ATase. Em experimentos realizados com GlnE nativa de *H. seropedicae*, a

atividade ATase ocorre na presença de GlnB, de GlnB-UMP<sub>3</sub> e mesmo na ausência dessas proteínas. Entretanto, a atividade na presença de GlnB é maximizada [56]. Nos experimentos que nós realizamos com a variante GlnE-C, observamos que GS foi adenililada na ausência e na presença de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub> (Fig. 16), corroborando o encontrado para a GlnE nativa. Entretanto, não foi observado a maximização da atividade de ATase na presença de GlnB, pois todas as condições foram significativamente iguais (Fig. 16). Nós também não observamos inibição da atividade na presença de 2-OG na presença ou ausência de GlnB e GlnB-UMP<sub>3</sub>, como observado na GlnE inteira (fig. 17).

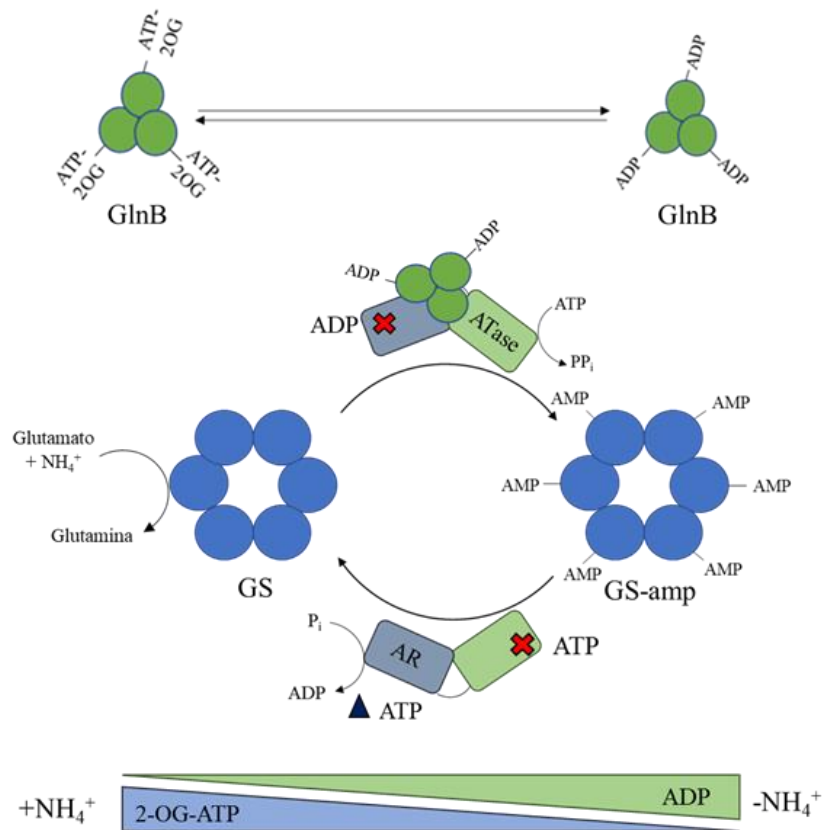
A aparente divergência entre os resultados encontrados para GlnE nativa e GlnE-C sugere que, provavelmente, a variante truncada perdeu o sítio de interação com GlnB, de forma que a atividade ATase que observamos é relativa à atividade encontrada na GlnE inteira sem a presença de GlnB ou GlnB-UMP<sub>3</sub>, sugerindo que o sítio de interação com GlnB está localizado na região N-terminal, assim como em *E. coli* e em *R. rubrum* [23, 44]. De fato, o experimento de *Pull-down* sugere que GlnB pode interagir com GlnE-N, na presença de nucleotídeos, sendo que a intensidade de bandas indica que a interação é mais significativa na presença de ADP e abolida quando há 2-OG (Fig. 19).

A GlnB de *H. seropedicae* possui afinidades semelhantes por ATP e por ADP [52]. Nessa proteína, ATP e 2-OG possuem efeito sinérgico, de forma que na presença de 2-OG a afinidade por ATP aumenta na GlnB não-modificada (cerca de 5 vezes) e na GlnB-UMP<sub>3</sub>, em menor escala [52]. As concentrações de ATP e ADP intracelulares em *H. seropedicae* não são conhecidas, mas em células de *E. coli* crescidas em condições de alto nitrogênio, a concentração intracelular de ATP cai de 2 mM para 1,8 mM e de ADP aumenta de 0,3 mM para 0,6 mM [32]. Em *H. seropedicae* as concentrações de 2-OG intracelulares em baixo nitrogênio são cerca de 4 vezes maiores (4,5 mM) do que as encontradas em *E. coli*, mas caem para cerca de 1,7 mM em condições de alto nitrogênio [52]. Dessa forma, em alto nitrogênio GlnB estará ligada a ATP e 2-OG, enquanto que em condições limitantes de nitrogênio, a ligação de ADP é favorecida. Essas observações sugerem que em alto nitrogênio, GlnB liga ATP e 2-OG e, nesse estado, não pode se ligar em GlnE, impedindo a estimulação da atividade ATase. Por outro lado, em condições de baixo nitrogênio, a ligação de ADP em GlnB é favorecida e, nesse caso, GlnB pode interagir com GlnE e estimular a atividade ATase. Simultaneamente, a diminuição de ATP diminui a atividade AR. Embora não demonstrado nesse trabalho, a ligação de ADP ao sítio regulador N-terminal provavelmente inibe a atividade AR.

Apesar do ATP ser um substrato da atividade ATase, experimentos com a versão completa de GlnE mostram que essa atividade é inibida por 1 mM de ATP, mas ocorre quando 0,2 mM é acrescentado ao mix de reação [56]. Nesse caso, em condições de baixo nitrogênio, a atividade ATase é inibida por falta de estímulo de GlnB e por modulação do ATP, mostrando que existe redundância na integração do sinal de energia. Ao mesmo tempo, a atividade AR é estimulada.

Nós observamos um aparente efeito inibitório do 2-OG sobre a atividade de GS não-modificada (Fig. 17 e 18), que em nosso conhecimento, não havia sido demonstrado anteriormente. A princípio, esse resultado parece ser paradoxal, uma vez que o 2-OG inibe a adenililação de GS. Entretanto, o 2-OG é um metabólito que conecta os metabolismos de carbono e nitrogênio e está sujeito a flutuações em função do balanço Carbono-Nitrogênio. Além disso, a glutamina produzida por GS é utilizada na síntese de glutamato, pela aminação de 2-OG na reação da GOGAT. A reação da GOGAT depende de NADPH. Dessa forma, essa observação de inibição direta do 2-OG sobre GS pode representar uma regulação estequiométrica do ciclo GS-GOGAT, que pode ser consequente do estado redox da célula. Entretanto, os resultados aqui apresentados são preliminares e são necessários outros estudos para um aprofundamento da regulação de 2-OG sobre GS.

Em suma, nossos dados, em conjunto com as observações com a GlnE inteira, sugerem o seguinte modelo para regulação da atividade de GS (Fig 19): em altas concentrações de nitrogênio, as concentrações intracelulares de ATP e 2-OG diminuem, favorecendo a ligação de ADP à GlnB. GlnB ligada a ADP interage com no domínio N-terminal de GlnE. A informação dessa interação é transmitida ao domínio C-terminal, que tem sua atividade estimulada. Simultaneamente, ADP se liga ao sítio de sensibilidade de energia em N-terminal, inibindo a atividade AR. Nessa condição, GS é adenililada. Por outro lado, em condições limitantes de nitrogênio, as concentrações de ATP e 2-OG aumentam. Nesse caso, GlnB liga ATP e 2-OG e nesse estado, GlnB não se liga à GlnE e não há estimulação de ATase. Simultaneamente, o aumento do ATP intracelular inibe a atividade ATase independente de GlnB e estimula a atividade AR. Assim, GS é desadenililada.



**Figura 20.** Modelo de regulação da atividade de GlnE em *H. seropedicae*. Em condições de alto amônio, GlnB liga ADP e nesse estado interage com o sítio em N-terminal de GlnE, estimulando a atividade ATase em C-terminal. Nessa condição, o ADP se liga no sítio de sensibilidade a energia em N-terminal e bloqueia a atividade AR. Em condições de baixo nitrogênio, as concentrações de ATP e 2-OG aumentam. Nessa condição, GlnB liga ATP e 2-OG. A ligação do 2-OG bloqueia a interação de GlnB no sítio em N-terminal, inibindo a atividade ATase. A Atividade ATase também é inibida por ATP, que ao mesmo tempo interage no sítio de sensibilidade em N-terminal e estimula a atividade AR.

## 5.Referências

1. Dixon, R.; Kahn, D.; Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation, **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.
2. Zehr, J.P; Jenkins, B.D.; Short, S.M.; Steward, G.F.; Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environ Microbiol.**, v. 5, p. 539-544, 2003.
3. Alves, B.J.R.; Boddey, R.M., Urquiaga, S. The success of BNF in Soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, 2003.
4. Merrick M.J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Simbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRRIS, R. H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, 1992. p. 835-876, 1992.
5. Patriarca E.J., Tatè R., Iaccarino M., Key Role of Bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Metabolism in *Rhizobium*-Plant Symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p.203-222, 2002.
6. Baldani, J.I., Baldani, V.L.D, Seldin, L., Dobereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
7. Olivares, F. L.; Jams, E.K.; Baldani, J.I.; Dobereiner, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugarcane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **New Phytol.**, v. 135, p. 723-737, 1997.
8. Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Sampaio, M.J.A. Dobereiner, M. J.A, Fourth *Azospirillum* species from cereal roots.**An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 56, p.365, 1984.

9. Monteiro, R.A., Balsanelli, E., Wassem, R., Marin A. *et al* *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, v.356(1), p.175–196 (2012).
10. Pankievicz, V.C.; Do Amaral, F.P.; Santos, K.F.; Agtuca, B.; *et al* Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant J.**, v. 81, p. 907-19, 2015.
11. Bástian, F.; Cohen, A.; Piccoli, P.; Luna, V.; Baraldi, R.; Bottini, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.**, v. 24, p. 7-11, 1998.
12. Gyaneshwar, P.; James, E.K.; Reddy, P.M.; Ladha, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum-tolerant rice varieties. **New Phytol.**, v. 154, p. 131-145, 2002.
13. Muthukumarasamy, R.; Govindarajan, M.; Vadivelu, M.; Revathi, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiol. Res.*, v. 161, p. 238-245, 2006.
14. Reitzer, L., Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-176, 2003.
15. Helling, L.B. Pathway Choice in Glutamate Synthesis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4571-4575, 1998.
16. Helling, L.B., Why Does *Escherichia coli* Have Two Primary Pathways for Synthesis of Glutamate? **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4664-4668, 1994.
17. Merrick, M. J.; Edwards, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.

18. Almassy, R.J.; Janson, C.A.; Hamlin, R. *et al* Novel subunit-subunit interaction in the structure of glutamine synthetase. **Nature**, v.323, p.25, 1986.
19. Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. U., & Rotstein, S. H. Structure--function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.1477, p.122–145. 2000.
20. Stadtman, E . R ; Ginsburg, A . The Glutamine Synthetase of *Escherichia coli*: Structure and Control **The Enzymes** v.10, p.755-807, 1974.
21. van Heeswijk, W.C.; Westerhoff, H.V.; Boogerd, F.C. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, p. 628-95, 2013.
22. Engleman, E.G.; Francis, S.; Cascade Control of *E. coli* Glutamine Synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.191, p.602-612, 1978.
23. Jiang, P.; Pioszak, A.A.; Ninfa, A.J. Structure-Function Analysis of Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*. **Biochemistry** v.46, p.4117-4132, 2007.
24. Noindorf, L.; Rego, L.F.; Baura, V.A. *et al* Characterization of the orf1glnKamtB operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.
25. Benelli, E.M; Souza, E.M.; Funayama, S. *et al* Evidence for Two Possible glnB-Type Genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.
26. Huergo, L.F.; Chandra, G.; Merrick, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond **FEMS Microbiol Rev** p.1-33, 2012.

27. Ninfa, A.J.; Magasanik, B., Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon of the *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 5909-5913, 1986.
28. Jiang, P.; Ninfa, A. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 1906-1911, 1999.
29. Kustu, S.; Santero, E; Keener, J.; *et al* Expression of  $\sigma$  54 (ntrA)-Dependent Genes Is Probably United by a Common Mechanism. *Microbiol.Rev.*, v. 53.p. 367-376, 1989.
30. Morett, E.; Segovia, L. The  $\sigma$  54 Bacterial Enhancer Binding-Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.
31. Arcondeguy, T.; Jack, R., Merrick, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.
32. Radchenko, M.V.; Thorton, J.; Merrick, M.; Control of AmtB-GlnK Complex Formation by Intracellular Levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarate. **The Journal of Biological Chemistry** v. 285, p. 31037-31045, 2010.
33. Huergo, L.F.; Pedrosa, F.O.; Santos-Muller, M; *et al* PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology** v. 159, p. 176-190, 2012.
34. Litte, R.; Colombo, V.; Leech, A.; Dixon, R.; Directe interaction of NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **The Journal of Biological Chemistry** v.277, p.15472-1581, 2002.



35. Oliveira, M.A.S.; Aquino, B.; Bonatto, A.C.; *et al* Interaction of GlnK with the GAF domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA mediates NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-regulation. **Biochimie**, v.94 p.1041-1047, 2012.
36. Rodrigues, T.E.; Gerhardt, E.C.M.; Oliveira, M.A.; *et al* Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner. **Molecular Biology**, v. 91. P. 751-761. 2014.
37. Cronan, J.E.; Waldrop, G.L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases **Progress in Lipid Research**, v.41 p.407-435, 2002.
38. Bourellier, A.B.; Valot, B.; Guillot, A. *et al* Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-Oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. **PNAS** v.107 p. 502-507, 2010.
39. Baud, S.; Bourillier, A.B.; Azzopardi, M.; *et al* PII is induced by WRINKLED1 and fine-tunes fatty acid composition in seeds of *Arabidopsis thaliana* **The Plant Journal**. v.64, p.291-303. 2010.
40. Pershun, D.C, Souza E.M., Steffens, M.B. *et al* The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 192, p. 217-221, 2000.
41. Noindorf, L., Rego F.G., Baura V.A. *et al* Characterization of the orf1glnKamtB operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.
42. de Zamaroczy, M.; Paquelin, A.; Peltre, G.; Forchhmer, K. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4143-4149, 1996.
43. de Zamaroczy, M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasiliense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol Microbiol.**, v. 29, p.449-463, 1998.

44. Jonsson, A.; Teixeira, P.F.; Nordlund, S.; The activity of adenylyltransferase in *Rhodospirillum rubrum* is only affected by  $\alpha$ -ketoglutarate and unmodified PII proteins, but not glutamine, *in vitro* **The FEBS Journal** v. 274, p.2449-2460, 2007.
45. Clancy, P.; Xu, Y.; van Heeswijk W.C *et al* The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain. **FEBS J.**, v.274, p.2865-2877, 2007.
46. Jaggi, R.; van Heeswijk, W.C.; Westwehoff, H.V. *et al* The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **The EMBO Journal**, v.16, p5562- 5571,1997.
47. Xu, Y.; Zhang, R.; Ollis, D.L. *et al* Structure of the N-terminal domain of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Adenylyltransferase **Structure** v. 12, p.861-869, 2004.
48. Xu, Y.; Carr, P.D.; Ollis, D.L. *et al* Structure of the Adenylylation domain of *E. coli* Glutamine Synthetase adenylyltransferase: evidence for gene duplication and Evolution of a new active site. **J. Mol. Biol.** V.396, p.773-784, 2010.
49. Campos, E.L.S. Construção e caracterização de uma estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* mutante no gene *glnE* – **Dissertação de Mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá), 2021.
50. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
51. Höpfner, D.; Fauser, J.; Kaspers, M.S. *et al* Monoclonal anti-AMP antibodies are sensitive and valuable tools for detecting patterns of AMPylation. **Cell Press** v.23, 2020.
52. Oliveira, M.A.S.; Gerhardt, E.C.M.; Huergo, L. *et al* 2-oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. **The FEBS Journal** v.282 p.4797-1809, 2015.
53. Bender, R. A.; Janssen, K.A; Resnick, A. D. *et al* Biochemical Parameters of Glutamine Synthetase from *Klebsiella aerogenes* **J. Bacteriol.** v. 129, p. 1001-1009, 1977

54. Niesen, F.H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The use of diferencial scanning fluorimetry to detect ligand interaction that promote protein stability. **Nature Protocols** v.2 p.2212-2221 2007.
55. Vivoli, M.; Novak, H.; Harmer, N. Determination of protein-ligand interaction using differential scanning fluorimetry **J. Vis. Exp.** 2014.
56. Tomazini, L.F. Regulação do estado de modificação pós-traducional da Glutamina Sintetase de *Herbaspirillum seropedicae* **Dissertação de Mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá), 2020.
57. Schumacher, J.; Behrends, V.; Pan, Z. *et al* Nitrogen and carbon status are integrated at the transcription level by the nitrogen regulator NtrC *in vivo*. **mBio** v. 4, 2013.