

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

MAURÍCIO TATSUO EMORI

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE URIDILIL-
REMOVEDORA (UR) DA ENZIMA GlnD DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Maringá
Fevereiro - 2018

MAURÍCIO TATSUO EMORI

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE URIDILIL-
REMOVEDORA (UR) DA ENZIMA GlnD 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 obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Marco Aurélio Schüler de Oliveira

Maringá

Fevereiro – 2018

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

E69r Emori, Mauricio Tatsuo
Regulação da atividade uridilil-removedora (UR) da
enzima GlnD de *Herbaspirillum seropedicase* / Mauricio
Tatsuo Emori. -- Maringá, 2018.
36 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de
Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de
Concentração: Biologia Celular e Molecular, 2018.

1. *Herbaspirillum seropedicase*. 2. Regulação. 3.
Metabolismo do nitrogênio. I. Oliveira, Marco
Aurélio Schuler de, orient. II. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área
de Concentração: Biologia Celular e Molecular. III.
Título.

CDD 21.ed. 572.4

AHS-CRB-9/1065


MAURÍCIO TATSUO EMORI

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE URIDILIL-REMOVEDORA (UR) DA ENZIMA GlND DE
Herbaspirillum seropedicæ

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: 15.1.2016

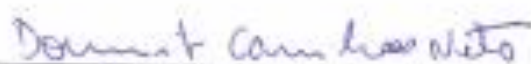
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira
Prof. Orientador
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini
Prof. Componente da Banca
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Doumit Camillo Neto
Prof. Componente da Banca
Universidade Estadual de Londrina

BIOGRAFIA

MAURÍCIO TATSUO EMORI nasceu em Gotenba/Japão, em 23 de maio de 1995. Possui graduação em Tecnologia em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Maringá (2015). Em março de 2016 iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Molecular na Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, PR.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao meu anjo da guarda.

Em especial agradeço ao Professor Dr. Marco Aurélio, pela orientação, paciência (muita), confiança e apoio na elaboração deste trabalho.

À Professora Dr^a. Ione, pela orientação e por me aceitar como orientando.

Aos professores Emanuel, Leda e Fábio, pela orientação e apoio.

À Coordenação e docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/UEM, pela oportunidade de realização desse curso.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

À minha querida família, minha mãe Mariza, meu pai Antônio, meus irmãos Gabriel, Maycom e Renan, meus tios Eliza e Celso e minha avó Clarice, que foram os maiores incentivadores dessa conquista.

Aos amigos de laboratório: Larissa e Eduardo pela ajuda durante toda a caminhada.

Aos amigos do mestrado em Biologia Celular e Molecular: Wagner, Fábio, Paulo, Breno, Eduardo, Lucas, Alex que enfrentaram comigo difíceis batalhas.

Aos Professores Wanderley, Rogério, Emy e Cida, que permitiram a utilização de equipamentos e reagentes de laboratórios.

Aos técnicos de laboratório Nunes, Cida, Cidinha, Luís, Odair e Suelen.

Aos demais amigos e professores dos Laboratórios de Oxidações Biológicas, Esteatose Hepática, Bioplan, Bioquímica de Microrganismos, Bioquímica Molecular e Organização Funcional do Núcleo.

Aos secretários Fabiano, Érica, Dirce e Bruna.

Ao COMCAP e técnicas Cíntia e Ana Paula.

Às novas amigas construídas em Maringá.

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 *The FEBS Journal* com modificações para facilitar o entendimento do texto.

Maurício Tatsuo Emori, Emanuel Maltempi de Souza, Leda Satie Chubatsu, Fábio de Oliveira Pedrosa, Marco Aurélio Schüller de Oliveira. Regulação da atividade uridilil-removedora (UR) da enzima GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS – A disponibilidade de nitrogênio fixado é um dos principais fatores limitantes para a produtividade agrícola. Naturalmente, o processo de fixação do nitrogênio é realizado por microrganismos chamados de diazotróficos. *Herbaspirillum seropedicae*, alvo do nosso trabalho, é uma bactéria diazotrófica capaz de estimular o crescimento vegetal. O metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae* é regulado por um sistema molecular conhecido como Ntr (“nitrogen regulation system”). As proteínas GlnD e PII que pertencem à esse sistema, participam como sensores primários dos níveis de nitrogênio intracelular. As proteínas PII têm como função a transdução de sinal e regulam a atividade de outras proteínas do sistema Ntr através de interação física. GlnD, por sua vez, é uma proteína bifuncional, podendo adicionar ou remover grupamentos UMP à PII. Dependendo do nível de nitrogênio intracelular, a atividade de remoção ou adição dos grupos UMP é intensificada, causando uma cascata de reações, culminando com a adaptação da bactéria as condições ambientais. O presente trabalho foi planejado para verificar como é regulada a atividade de desuridililação da proteína GlnD selvagem e com mutações. Para isso foram avaliados os efeitos das concentrações de Mg^{2+} , Mn^{2+} , ATP, ADP, glutamina e 2-oxoglutarato.

MATERIAIS E MÉTODOS – Plasmídeos de expressão contendo os genes que codificam as proteínas GlnD e GlnK de *H. seropedicae* foram usados para a superexpressão heteróloga dessas proteínas na estirpe BL21 de *Escherichia coli*. A expressão foi induzida com a adição de 0,5 mM de IPTG e ocorreu por 3 horas a 37°C para a proteína GlnK, e por 16 horas a 16°C para GlnD. Após serem superexpressas, as proteínas foram purificadas utilizando uma coluna de heparina (para GlnK) ou coluna de afinidade carregada com níquel (para GlnD). Para a construção de versões truncadas de GlnD de *H. seropedicae*, primeiramente foi realizada uma análise *in silico* dos domínios. A partir do resultado obtido foram construídas cinco versões diferentes de GlnD, utilizando oligonucleotídeos específicos para cada mutante. Os genes que expressam as proteínas GlnD mutantes foram amplificados e ligados ao vetor pET28a. As versões de GlnD mutantes foram superexpressas nos mesmos moldes da proteína GlnD selvagem. Devido a questões de solubilidade, o mutante GlnD Δ ACT foi a única versão a ser purificada. Com as proteínas GlnK, GlnD e GlnD Δ ACT purificadas, foram realizados testes para verificar os efeitos de efetores moleculares (Mg^{2+} , Mn^{2+} , ATP, ADP, glutamina e 2-oxoglutarato) na atividade de desuridililação. A atividade de GlnD foi verificada por análises do grau de modificação pós-traducional de GlnK através de eletroforese de gel de poliacrilamida não desnaturante. A quantificação das bandas proteicas visualizadas no gel foi feita com auxílio do programa ImageJ e os resultados foram plotados em gráficos expressos em quantidade relativa de monômeros de GlnK uridililados.

RESULTADOS – Os principais resultados foram os seguintes:

- 1) A atividade uridilil-removida (UR) de GlnD de *Herbaspirillum seropedicae* é maior quando adicionado o íon Mn^{2+} em comparação com Mg^{2+} ;
- 2) Glutamina estimulou a atividade UR, enquanto que 2-oxoglutarato (2-OG) inibiu a desuridililação;

- 3) A adição de glutamina na concentração 10mM reverteu a inibição de 2-OG na concentração 2mM;
- 4) O efeito inibitório de 2-OG só foi observado na presença de ATP, não ocorrendo quando somente ADP foi adicionado;
- 5) Cinco versões do gene que expressa GlnD de *H. seropedicae* foram construídas, clonadas e transformadas nas estirpes TOP10 e BL21 de *E. coli*;
- 6) GlnD Δ ACT foi a primeira versão a ser purificada e caracterizada;
- 7) A enzima mutante GlnD Δ ACT teve sua atividade uridilil-transferase (UTase) desregulada, fazendo com que ocorresse um ciclo fútil de uridililação e posterior desuridililação;
- 8) GlnD Δ ACT teve atividade UR diferente da enzima selvagem, perdendo sensibilidade ao 2-OG e à glutamina.

DISCUSSÃO – Com os resultados obtidos, foi possível observar que a atividade UR de GlnD de *H. seropedicae* foi estimulada por glutamina e inibida por 2-OG. Com a adição de mais glutamina, foi observada que a inibição por 2-OG foi revertida, possivelmente pela competição desses dois efetores pela ligação em GlnD. Entretanto, os resultados com 2-OG mostraram que a atividade inibitória do efector só foi verificada na presença de ATP, mostrando que isso pode ter ocorrido devido à ligação de 2-OG em PII ao invés de GlnD. Para verificar a atividade regulatória dos domínios de GlnD, foram construídas cinco versões diferentes do gene que expressa a proteína GlnD. A versão GlnD Δ ACT foi purificada e teve sua atividade caracterizada. Com relação à atividade UTase do mutante, foi observada que a enzima realiza um ciclo fútil de uridililação e desuridililação. Esse resultado mostra que o domínio ACT da enzima selvagem tem uma função reguladora, controlando tanto a atividade UTase quanto a UR. A atividade UR do mutante GlnD Δ ACT também foi diferente da encontrada na enzima selvagem, mostrando que essa versão perdeu a sensibilidade tanto por 2-OG quanto por glutamina. Esse resultado demonstra que 2-OG também se liga à GlnD na presença de ATP. Para confirmar as hipóteses, estudos adicionais serão realizados.

CONCLUSÕES – O presente estudo demonstrou que a proteína GlnD de *H. seropedicae* possui características únicas que a diferem de outras proteínas ortólogas estudadas até o presente momento. O presente trabalho reúne evidências que 2-OG exerce efeito inibitório sobre a desuridililação por ligação direta em GlnD, ao mesmo tempo que possui uma forte evidência de que esse efeito sobre a desuridililação é por sua ligação à proteína PII. Para a solução dessa questão, novos experimentos serão realizados.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND OBJECTIVES - The availability of fixed nitrogen is one of the main limiting factors for agricultural productivity. Naturally, the nitrogen fixation process is performed by microorganisms called diazotrophs. *Herbaspirillum seropedicae*, the target of our work, is a diazotrophic bacterium capable of stimulating plant growth. The nitrogen metabolism in *H. seropedicae* is regulated by a molecular system known as Ntr ("nitrogen regulation system"). The GlnD and PII proteins belonging to this system participate as primary sensors of intracellular nitrogen levels. PII proteins function to signal transduction and regulate the activity of other Ntr proteins through physical interaction. GlnD, on the other hand, is a bifunctional protein, being able to add or remove UMP clusters to PII. Depending on the level of intracellular nitrogen, the removal or addition activity of the UMP groups is intensified, causing a cascade of reactions, which culminates with the adaptation of the bacteria to its environment. The present work was designed to verify how the wild-type and mutated GlnD protein deuridylylation activity is regulated. For this, the effects of Mg^{2+} , Mn^{2+} , ATP, ADP, glutamine and 2-oxoglutarate concentrations were evaluated.

MATERIALS AND METHODS – Expression plasmids carrying the *H. seropedicae* GlnK and GlnD proteins coding genes were used for heterologous overexpression of these proteins at the BL21 *Escherichia coli* strain. Expression was induced upon the addition of 0.5 mM IPTG and occurred for 3 hours at 37°C for the GlnK protein, and for 16 hours at 16°C for GlnD. After being overexpressed, the proteins were purified using a heparin- column (for GlnK) or a nickel-loaded affinity column (for GlnD). For the construction of truncated GlnD versions of *H. seropedicae*, an *in silico* analysis of the domains was first performed. From the result obtained five different versions of GlnD were constructed, using oligonucleotides specific for each mutant. The genes expressing the mutant GlnD proteins were amplified and ligated to the pET28a vector. The mutant GlnD versions were overexpressed in the same molds as the wild-type GlnD protein. Due to solubility issues, the GlnD Δ ACT mutant was the only version to be purified. With purified GlnK, GlnD and GlnD Δ ACT proteins, tests were performed to verify the effects of molecular effectors (Mg^{2+} , Mn^{2+} , ATP, ADP, glutamine and 2-oxoglutarate) on the deuridylylation activity. Protein samples were analyzed by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Quantification of the protein bands visualized on the gel was done with the aid of the ImageJ program and the results were plotted on graphs expressed in relative quantity of uridylylated GlnK monomers.

RESULTS - The main results were as follows:

- 1) The uridylyl-remover activity (UR) of GlnD from *Herbaspirillum seropedicae* is higher when Mn^{2+} ion is added compared to Mg^{2+} ;
- 2) Glutamine stimulated UR activity, whereas 2-oxoglutarate (2-OG) inhibited deuridylylation;
- 3) The addition of glutamine at 10mM concentration reversed the inhibition of 2-OG in 2mM concentration;
- 4) The inhibitory effect of 2-OG was only observed in the presence of ATP, not occurring when only ADP was added;
- 5) Five versions of the gene expressing GlnD from *H. seropedicae* were constructed, cloned and transformed into strains TOP10 and BL21 of *E. coli*;
- 6) GlnD Δ ACT was the first version to be purified and characterized;

- 7) The GlnD Δ ACT mutant enzyme had its unregulated uridylyl transferase (UTase) activity, causing a fluid cycle of uridylylation and subsequent deuridylylation;
- 8) GlnD Δ ACT had UR activity different from the wild-type enzyme, losing sensitivity to 2-OG and glutamine.

DISCUSSION - With the obtained results, it was possible to observe that the UR activity of GlnD of *H. seropedicae* was stimulated by glutamine and inhibited by 2-OG. With the addition of more glutamine, it was observed that the inhibition by 2-OG was reversed, possibly by the competition of these two effectors by GlnD binding. However, the results with 2-OG showed that the inhibitory activity of the effector was only verified in the presence of ATP, showing that this could have occurred due to the binding of 2-OG in PII instead of GlnD. To verify the regulatory activity of the GlnD domains, five different versions of the GlnD expressing gene were constructed. The GlnD Δ ACT version was purified and had its activity characterized. With respect to the UTase activity of the mutant, it was observed that the enzyme carries out a futile cycle of uridylylation and desuryldilylation. This result shows that the ACT domain of the wild-type enzyme has a regulatory function, controlling both UTase and UR activity. The UR activity of the GlnD Δ ACT mutant was also different from that found in the wild-type enzyme, showing that this version lost sensitivity by both 2-OG and glutamine. This result demonstrates that 2-OG also binds to GlnD in the presence of ATP. To confirm the hypotheses, additional studies will be conducted.

CONCLUSIONS - The present study demonstrated that the GlnD protein of *H. seropedicae* has unique characteristics that differ from other orthologous proteins studied up to the present moment. The present work gathers evidence that 2-OG exerts an inhibitory effect on the deuridylylation by direct binding in GlnD, while it has strong evidence that this effect on deuridylylation is due to its binding to the PII protein. For the solution of this question, new experiments will be carried out.

Regulação da atividade uridilil-removedora (UR) da enzima GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*

Emori, M. T.¹; Souza, E. M.²; Chubatsu, L. S.²; Pedrosa, F. O.²; Oliveira, M. A. S.¹

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

² Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Curitiba, Paraná, Brasil.

Resumo

O metabolismo de nitrogênio em bactérias é controlado pelo sistema geral conhecido como Ntr. As proteínas PII são componentes importantes desse sistema, modulando o metabolismo celular através de interação física com proteínas-alvo. A bactéria alvo do presente estudo, *Herbaspirillum seropedicae*, é um organismo fixador de nitrogênio capaz de colonizar os tecidos internos de plantas com interesse econômico e, portanto, tem um importante potencial para ser utilizada como um biofertilizante. *H. seropedicae*, possui duas proteínas PII: GlnB e GlnK. A interação das proteínas PII com as proteínas-alvo é regulada por uridililação pós-traducional e pela ligação de efetores alostéricos. A uridililação e a desuridililação de PII são catalisadas pela enzima bifuncional GlnD. O exato mecanismo de regulação de GlnD ainda não está bem esclarecido. O presente trabalho pretende caracterizar a regulação da atividade de desuridililação da proteína GlnD de *H. seropedicae*. Para isso, as proteínas envolvidas no processo foram purificadas, e o estado de modificação pós-traducional das proteínas PII foi avaliado por gel de eletroforese não desnaturante. A atividade de desuridililação foi fortemente estimulada por glutamina e reprimida por 2-oxoglutarato (2-OG), sendo que essa repressão foi forte o suficiente para suprimir o estímulo de glutamina sobre a atividade enzimática. Uma versão mutante da proteína GlnD, com o domínio ACT deletado (GlnD Δ ACT), foi construída e sua atividade analisada. GlnD Δ ACT foi insensível aos efetores moleculares, catalisando o ciclo de uridililação e desuridililação independentemente dos níveis de glutamina e 2-OG. Os resultados apresentados aqui sugerem que a enzima GlnD de *H. seropedicae* é capaz de sensoriar a razão glutamina/2-OG, bem como realizar a ligação com esses efetores. Os resultados também indicam que o domínio ACT é um sensor de sinais ambientais que indicam a disponibilidade de nitrogênio.

Palavras chaves: *Herbaspirillum seropedicae*; regulação; metabolismo do nitrogênio.

1. Introdução

1.1. *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa, vibrióide, membro da classe β do filo proteobactérias e endofítica, ou seja, capaz de colonizar tecidos de plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro [1] [2] [3]. *H. seropedicae* é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio. Microrganismos com essa capacidade são conhecidos como diazotrofos. Evidências recentes apontam que o nitrogênio fixado por *H. seropedicae* é incorporado na biomassa da planta hospedeira [4]. Além disso, estudos demonstraram que bactérias do gênero *Herbaspirillum* podem produzir fitohormônios como ácido 3-indolacético (AIA), giberelinas A₁ e A₃ e compostos indólicos [5] [6]. Ensaios com a inoculação de *H. seropedicae* em culturas de milho resultaram em aumento no diâmetro basal do colmo, matéria seca da parte aérea e produtividade de grãos [3] [7], mostrando que *H. seropedicae* tem grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante, sendo uma alternativa eficiente e menos poluente que os fertilizantes nitrogenados.

1.2. Assimilação de nitrogênio

O amônio é a principal fonte de nitrogênio de bactérias e a sua assimilação consiste na sua combinação com o esqueleto carbônico de 2-OG para formar glutamina e glutamato pelas vias GS/GOGAT ou GDH [8]. A enzima GDH (glutamato desidrogenase) converte amônio e 2-OG em glutamato. Quando a enzima GS (Glutamina Sintetase) é usada, o glutamato é aminado à glutamina, a qual tem seu grupo amida transferido para o 2-OG pela enzima GOGAT (Glutamato Sintase) para formar duas moléculas de glutamato. Em *Escherichia coli*, a via GS/GOGAT parece ser importante para sintetizar glutamato quando a concentração de amônio é baixa, enquanto a via GDH é a preferida em condições de limitação de energia, já que a primeira envolve o consumo de ATP [9].

A enzima GS é regulada tanto alostericamente quanto por modificação covalente. Alostericamente, alanina, glicina e outros seis produtos finais do metabolismo da glutamina participam da regulação de GS [10]. Outra forma de regulação é por adenililação/desadenililação, cuja reação é catalisada pela enzima bifuncional ATase (GlnE) [11] [12]. A enzima ATase, por sua vez, tem sua atividade regulada pelas proteínas do tipo PII. Em altos níveis de nitrogênio fixado, ATase

complexa com GlnB livre e catalisa a adenililação de GS, inativando-a. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a GS é ativada por desadenililação também catalisada pela ATase complexada a GlnB-UMP [13].

1.3. Sistema Ntr

As vias bioquímicas de utilização de nitrogênio são reguladas para evitar a perda desnecessária de energia, maximizando o uso do nitrogênio disponível. Os sistemas de controle do metabolismo variam de acordo com o organismo. Em proteobactérias, o metabolismo de nitrogênio é regulado por um sistema molecular geral conhecido como Ntr (“nitrogen regulation system”), composto por diversas proteínas, entre elas NtrB, NtrC, GlnD, PII (GlnB e GlnK), ATase (GlnE), glutamina sintetase (GS), e AmtB [8].

1.3.1 Proteínas PII

No sistema Ntr, destacam-se as proteínas do tipo PII. Essas proteínas são homotrímeros cujos monômeros são compostos por 112 resíduos de aminoácidos e têm como função a transdução de sinal, regulando a atividade de uma grande variedade de proteínas através de interação física com seus alvos [14]. Entre os alvos das proteínas PII encontram-se proteínas de membrana, enzimas e fatores de transcrição, que podem estar envolvidos no metabolismo de nitrogênio [14]. Em *H. seropedicae*, dois genes codificam proteínas PII: *glnB*, que é monocistrônico e expresso constitutivamente [15] e *glnK*, que é co-transcrito com os genes *amtB* (codifica um transportador de amônio) e *nlnA* (codifica uma proteína com função desconhecida). O operon *nlnA-glnK-amtB* é transcrito a partir de um promotor σ^{54} dependente de NtrC, e sua expressão é induzida em condições limitantes de nitrogênio [16]. Em *E. coli*, GlnB e GlnK possuem 67% de identidade e apresentam várias funções compartilhadas [17] [18]. GlnB de *H. seropedicae* possui 73% de identidade e 83% de similaridade com a GlnB de *E. coli* e 67% de identidade e 76% de similaridade com a enzima GlnK de *E. coli* [19].

As proteínas pertencentes à família PII tem alta homologia de sequências e estrutura tridimensional bastante conservada. No trímero de PII, cada monômero, com massa de aproximadamente 12 kDa, é composto por duas α -hélices e 6 folhas β -pregueadas (Figura 1) [19]. As α -hélices e as folhas β -pregueadas formam um motivo estrutural em forma de barril conhecido como $\beta\alpha\beta$ duplo. Esses dois motivos são conectados por uma volta longa, conhecida como *loop-T*, que compreende os resíduos

de aminoácido 37-55, incluindo o resíduo Tirosina 51, alvo de uma modificação pós-traducional. Cada monômero de PII ainda possui mais dois *loops* menores: B e C. O *loop-B* conecta a segunda α -hélice à quarta folha β , e o *loop-C* se encontra na região C-terminal [20]. No trímero de PII, os *loops* B e T de um monômero e o *loop-C* do monômero adjacente formam uma cavidade entre as subunidades que serve como sítio de ligação para efetores moleculares [21] (Figura 2).

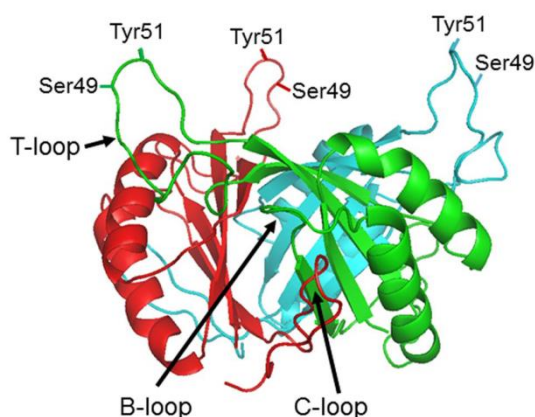


Figura 1 - Modelo estrutural da proteína GlnK de *E. coli*. Retirado de [22].

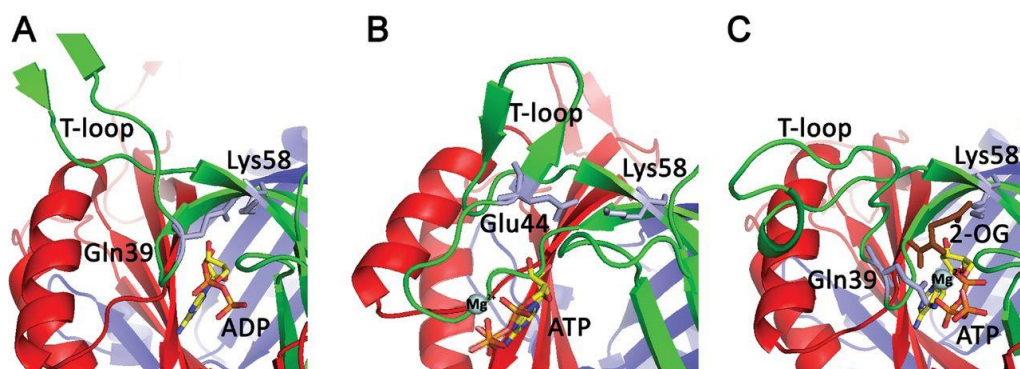


Figura 2 – Sítio de ligação de efetores da proteína GlnK. (A) GlnK de *E. coli* ocupada por ADP. (B) PII de *Synechococcus elongatus* ocupada com ATP. (C) PII de *S. elongatus* ocupada com ATP e 2-OG. Retirada de [21].

As interações das proteínas PII com seus alvos, e o efeito que causam neles, são regulados em dois níveis: pós-traducionalmente e ligação de efetores moleculares [23]. Quanto à regulação alostérica, cada trímero de PII possui três sítios para ligação de ATP ou ADP e 2-oxoglutarato (2-OG), sendo que a ligação desses efetores apresenta cooperatividade negativa [11] [24]. 2-OG só consegue se ligar após a ligação de ATP, que envolve a coordenação de um íon Mg^{2+} pelos dois efetores. Mudanças na ocupação

do sítio de ligação de efetores em PII alteram a conformação do *loop*-T dessas proteínas, contribuindo para a modulação da interação de PII com seus alvos.

Em *H. seropedicae*, as proteínas PII são covalentemente modificadas por uridililação (adição de um grupamento UMP) no resíduo de tirosina 51 no *loop*-T [25]. Estudos com PII e PII-UMP cristalizadas, mostraram que uma diferença marcante entre as estruturas é em relação a fixação do *loop*-T, sendo que na forma uridililada o *loop*-T parece ser mais móvel, podendo adotar várias conformações diferentes [26]. O efeito dos efetores alostéricos e da modificação covalente na interação das proteínas PII de *H. seropedicae* com uma proteína alvo já foi demonstrada [27].

1.3.2 Proteína GlnD

1.3.2.1 Reações catalisadas por GlnD

A proteína GlnD é uma proteína bifuncional reguladora da atividade das proteínas PII [28]. GlnD apresenta duas atividades enzimáticas: função uridilil-transferase (UTase) e uridilil-removedora (UR), ou seja, é capaz de adicionar ou remover grupamentos uridilil ao resíduo conservado de tirosina (Y51) presente no *loop*-T de PII. A reação de desuridililação não é apenas a reversão da reação de uridililação: essas duas reações são catalisadas por domínios distintos da proteína. O sistema PII-GlnD atua como uma unidade de controle do metabolismo de nitrogênio e da sinalização de glutamina na bactéria [29]. A atividade UTase de GlnD foi relatada pela primeira vez no ano de 1971 [30], mostrando a conversão de PII a PII-UMP na presença de ATP, 2-OG e UTP, e sendo inibida por glutamina. Posteriormente, estudos reportaram a atividade UR de GlnD bem como a necessidade de íons divalentes Mn^{2+} e/ou Mg^{2+} , ATP e 2-OG [31] [32].

Em condições limitantes de nitrogênio, a atividade UTase de GlnD é estimulada, adicionando um grupo UMP de um UTP a cada subunidade do trímero PII. Esse processo ativa uma cascata de reações culminando na adaptação do metabolismo da bactéria à essas condições [14].

1.3.2.2 Domínios de GlnD

A proteína GlnD pode ter diferentes estruturas e funções na célula dependendo da espécie que a expressa. As proteínas GlnD de *E. coli* e *Rhodospirillum rubrum*, por exemplo, possuem quatro domínios distintos: um domínio N-terminal

nucleotidotransferase (NT), um domínio central HD, contendo um resíduo conservado de histidina e aspartato [33], e dois domínios C-terminais ACT (aspartato quinase-corismato mutase-TyrA) [34] [35], esquematizados na figura 3. Por outro lado, a proteína GlnD de *Sinorhizobium meliloti* possui 4 domínios ACT [36], enquanto a GlnD de *Corynebacterium glutamicum* não possui domínios ACT e tem atividade de adenililação e desadenililação de GlnK [37].

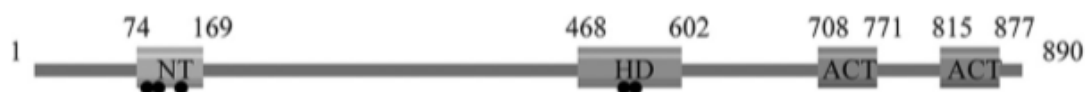


Figura 3 - Localização dos domínios de GlnD de *E. coli*. Retirado de [35]. Os pontos indicados representam os resíduos conservados nos domínios NT e HD.

Em *E. coli* e *R. rubrum*, o domínio NT é responsável pela atividade UTase e apresenta dois resíduos conservados de glicina e aspartato em sua estrutura [38]. Esse domínio também possui dois resíduos conservados de aspartato, envolvidos na ligação de íons metálicos Mg^{2+} e Mn^{2+} , essenciais para a catálise dos substratos [35]. O domínio NT não é essencial para a atividade UR, porém parece estar envolvido na ligação de Mg^{2+} para atividade UR [35].

O domínio HD tem sido relacionado à uma superfamília de fosfohidrolases dependente de metais [34]. Estudos realizados por Zhang e colaboradores [35] utilizando *R. rubrum* e *E. coli* com GlnD mutantes *in vivo*, mostraram que tanto o domínio HD quanto os domínios C-terminais ACT não são essenciais para a atividade UTase. Por outro lado, os experimentos com GlnD mutantes de *E. coli* mostraram que o domínio HD é essencial para a atividade UR, demonstrando que as funções UTase e UR não dividem o mesmo sítio [35].

O domínio ACT está presente em várias enzimas e vem sendo relacionado como um domínio regulatório bastante conservado [39] [40]. Tipicamente, o domínio ACT contém sítios de ligação à efetores moleculares, que podem modular a atividade da proteína que o contém [34]. Variantes de GlnD mutantes de *E. coli* nos domínios C-terminais ACT apresentaram menores atividades UTase, sugerindo que esses domínios podem estar envolvidos em parte da regulação de UTase. Esses domínios podem também estar envolvidos na regulação de UR, evitando um ciclo fútil de uridililação e desuridililação [35]. Além disso, estudos demonstraram que essas proteínas mutantes

perderam a capacidade de sensoriar os níveis de glutamina, bem como sua capacidade de ligação com o efetor [35]. Entretanto, dados *in vivo* com estirpes mutantes de *E. coli* com deleção no domínio ACT de GlnD mostraram que, mesmo com a mutação, a célula ainda conseguia sentir os níveis de nitrogênio, sugerindo que ou a glutamina se liga a outro domínio de GlnD ou podem existir outros mecanismos que atuam em conjunto com a proteína GlnD como sensores dos níveis de nitrogênio intracelular [41].

1.4. Regulação transcricional do sistema Ntr

Um nível de resposta do sistema Ntr de Proteobactérias à falta de amônio disponível no ambiente envolve regulação transcricional, que tem como objetivo ativar a expressão de enzimas de vias alternativas de captura de nitrogênio (Figura 4) [42]. A regulação transcricional do sistema Ntr é exercida pelo sistema de dois componentes NtrB-NtrC. NtrB e NtrC são proteínas membros de famílias de transdutores de sinal, onde uma proteína receptora tem um domínio conservado fosforilado controlando a atividade de uma proteína regulatória. NtrB é uma histidina quinase/fosfatase e NtrC é a proteína regulatória correspondente [43]. NtrC faz parte do grupo de proteínas que ativam a transcrição dependente de RNA polimerase- σ^{54} [44] [45]. Apenas NtrC fosforilada é capaz de ativar a transcrição a partir de promotores alvo e sua fosforilação é catalizada por NtrB.

Em baixos níveis de glutamina, proteínas PII são uridililadas e controlam o regulador NtrB [46]. Nessas condições, NtrB fosforila NtrC, que se liga a sequências de DNA no promotor e, em conjunto com o fator σ^{54} , ativam a transcrição. Em condições com alta concentração de glutamina, a atividade uridilil-removedora (UR) é aumentada, removendo grupamentos UMP de PII, que na forma desuridililada interage com NtrB. Dessa forma, NtrB não consegue fosforilar NtrC que conseqüentemente é incapaz de ativar o promotor σ^{54} [14].

Em *H. seropedicae*, uma das proteínas cuja a expressão é regulada por esse sistema é a proteína NifA, responsável por ativar a transcrição de genes envolvidos na fixação de nitrogênio [47] [48]. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, NtrC fosforilada estimula a transcrição do gene *nifA* a partir de seu promotor σ^{54} , e o produto da transcrição, NifA, irá ativar a transcrição dos genes de fixação de nitrogênio [46] [47].

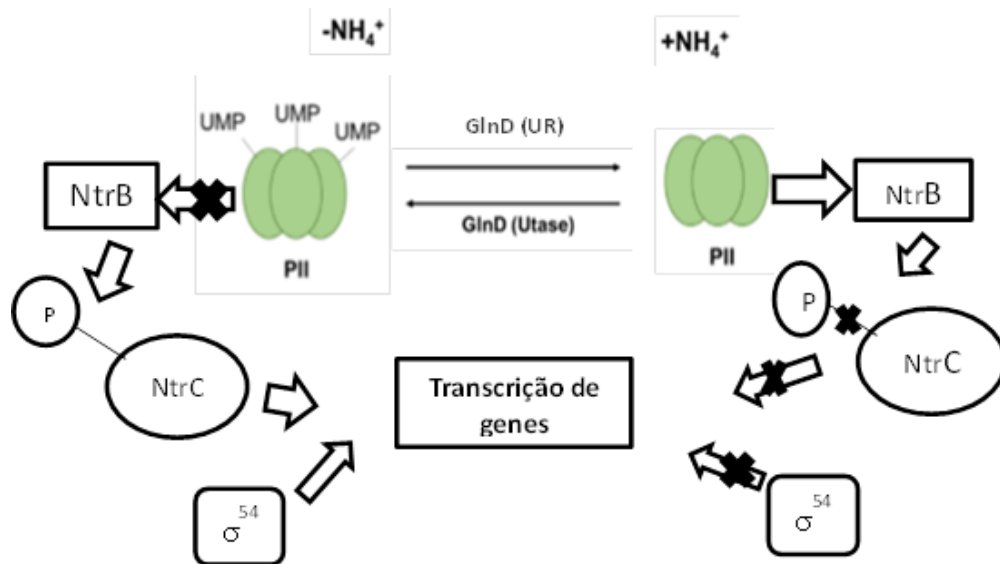


Figura 4 – Modelo da regulação transcricional do sistema Ntr. Fonte: o autor.

2. Resultados e Discussão

2.1. Ensaios de desuridililação das proteínas PII

2.1.1 Determinação do íon metálico divalente requerido para a reação de desuridililação

Para monitorar a atividade de GlnD, é possível verificar o estado de uridililação pós-traducional das proteínas PII através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. Como as proteínas PII são homotrímeros, onde cada monômero pode ser uridililado, elas podem existir em 4 estados diferentes: PII, PII-UMP, PII-UMP₂ e PII-UMP₃, as quais são separadas em gel nativo devido ao aumento da migração conferido pela carga negativa como consequência da adição de um grupamento UMP. Um exemplo de separação dessas formas de PII está na figura 5 a seguir.

Com o objetivo de se determinar o metal divalente requerido para a atividade de desuridililação da enzima GlnD de *H. seropedicae*, a reação foi realizada *in vitro* com as proteínas purificadas na presença de Mg²⁺ e Mn²⁺. O resultado está mostrado na figura 5.

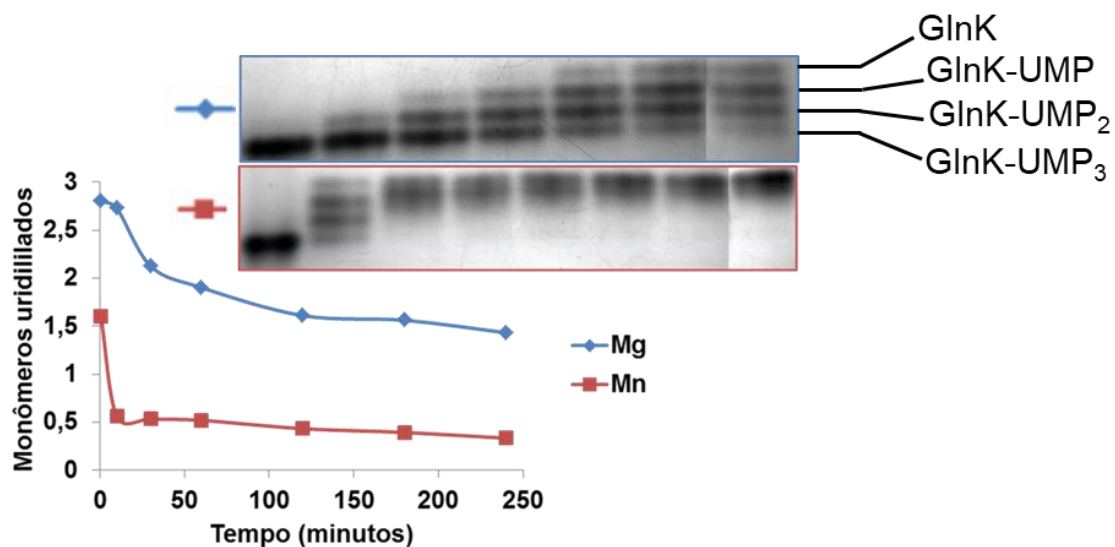


Figura 5 – Efeito dos íons Mg^{2+} e do Mn^{2+} sobre a desuridilação de GlnK (curva de tempo). As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μ M, ATP 1 mM, glutamina 5 mM, e 25 mM do metal indicado, e foram disparadas com GlnD 0,2 μ M. Em cada tempo indicado no gráfico, alíquotas de 10 μ L das reações foram retiradas e paradas com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica e a quantidade relativa das bandas correspondentes a cada estado de uridilação foi utilizada para o cálculo de média de monômeros uridililados.

O resultado mostrado na figura 5 indica que a reação de desuridilação parece envolver preferencialmente íons Mn^{2+} em vez de Mg^{2+} , já que na presença de Mn^{2+} , após cinco minutos de reação, a banda predominante já era a da proteína não uridililada. Na reação com Mg^{2+} , por sua vez, a proteína PII encontrava-se parcialmente uridililada mesmo após 250 minutos de reação.

No entanto, as concentrações intracelulares de Mg^{2+} e de Mn^{2+} são desconhecidas [35]. Assim, as concentrações dos metais divalentes do experimento *in vitro* mostrado na figura 5 poderiam ser bastante diferentes da condição intracelular, na qual o Mg^{2+} , por existir em maior concentração, poderia ocupar o sítio ativo da porção UR de GlnD por competição com o Mn^{2+} . Para verificar essa hipótese, o experimento foi repetido na presença de diferentes razões $Mg^{2+}:Mn^{2+}$. O resultado está mostrado na figura 6 a seguir.

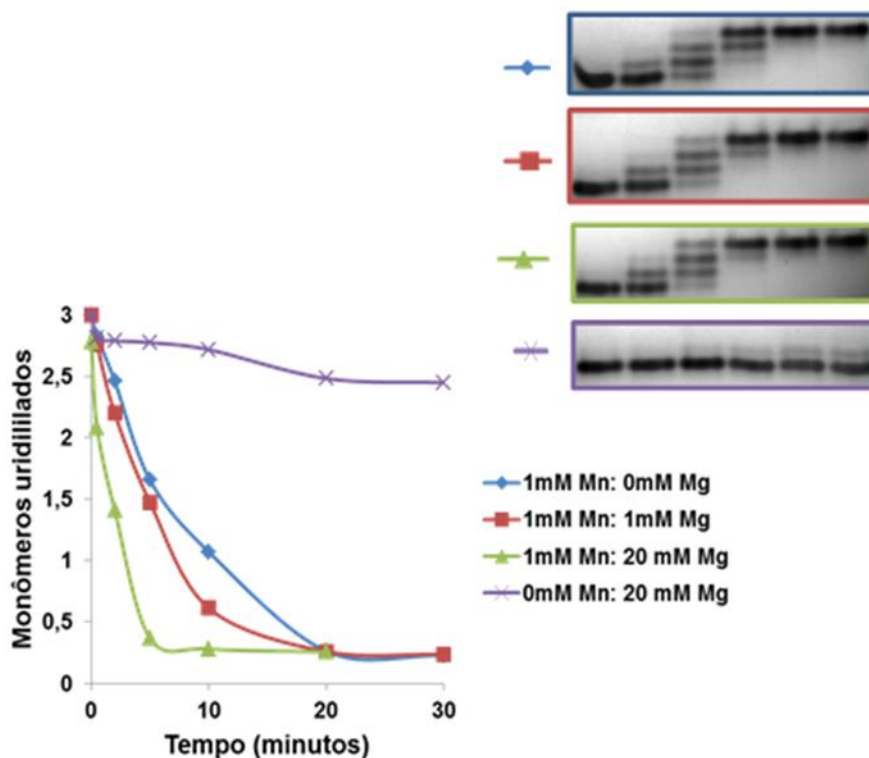


Figura 6 – Desuridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* na presença de diferentes razões $Mg^{2+}:Mn^{2+}$ (curva de tempo). As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μ M, ATP 1 mM, glutamina 5 mM, e metais nas concentrações indicadas no gráfico, e foram disparadas com GlnD 0,2 μ M. Nos tempo 30", 2', 5', 10', 20' e 30', foi retirada uma alíquota de 10 μ L das reações e a reação foi parada com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica e a quantidade relativa das bandas correspondentes a cada estado de uridililação foi utilizada para o cálculo de média de monômeros uridililados.

Os resultados na figura 6 confirmam que de fato íons Mn^{2+} e não Mg^{2+} parecem estar envolvidos na catálise da desuridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae*. Mesmo que as concentrações intracelulares de íons Mn^{2+} e Mg^{2+} sejam desconhecidas, o resultado apresentado na figura 6 mostra que com um excesso molar de vinte vezes de Mg^{2+} em relação ao Mn^{2+} , o padrão da curva de desuridililação foi semelhante àquela encontrada para a presença de apenas Mn^{2+} na concentração de 1 mM. Em todas as combinações de metais testadas a cinética da desuridililação foi semelhante, com exceção da condição sem Mn^{2+} , contendo Mg^{2+} como único íon metálico.

Em *E. coli*, a atividade UR de GlnD é observada na presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} , embora a eficiência da reação com Mn^{2+} tenha sido cerca de 5 vezes maior do que na presença de Mg^{2+} [49]. Em *R. rubrum*, por sua vez, nenhuma atividade UR é observada

na ausência de Mn^{2+} , mesmo quando o Mg^{2+} está presente [50]. Os resultados aqui mostrados indicam que a atividade UR da enzima GlnD de *H. seropedicae* é fortemente estimulada por íons Mn^{2+} , mesmo na presença de um excesso molar de Mg^{2+} . Esses resultados permitem concluir que o metal envolvido na reação UR da enzima GlnD de *H. seropedicae* é o Mn^{2+} , semelhante ao encontrado em *R. rubrum*. Por isso, todos os experimentos cinéticos apresentados na sequência foram feitos com tampão contendo Mn^{2+} , a não ser quando indicado.

2.1.3 Ligação de 2-OG a GlnK de *H. seropedicae* ligada a MnATP

Diversos trabalhos têm caracterizado a interação entre as proteínas PII com seus ligantes alostéricos [12] [24] [51] [52]. Em todos os casos, o sítio de ligação de 2-OG das proteínas PII só é formado após a ligação de ATP a elas. Todos esses trabalhos caracterizaram a ligação do 2-OG em meio de reação contendo o íon Mg^{2+} , que participa da coordenação do ATP no seu sítio de ligação. No entanto, neste trabalho são apresentados experimentos de regulação por 2-OG e glutamina feitos na presença de íons Mn^{2+} . Para verificar se o padrão de ligação do 2-OG à proteína GlnK ligada a MnATP era semelhante à proteína ligada a MgATP, a interação foi analisada por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A comparação dos termogramas da ligação do 2-OG na presença de MgATP ou MnATP está mostrada na figura 7.

Os resultados mostrados na figura 7 indicam que o 2-OG parece ligar ao sítio de ligação de efetores da proteína GlnK de *H. seropedicae* com a mesma afinidade se eles já estiverem ocupados com MgATP ou MnATP, e com a mesma variação de entalpia, indicando que parece não existir diferença na ligação de 2-OG à proteína PII com relação à presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Portanto, os conhecimentos sobre a interação entre 2-OG e PII provenientes de experimentos feitos na presença de íons Mg^{2+} podem ser extrapolados para o modelo no qual Mn^{2+} está presente.

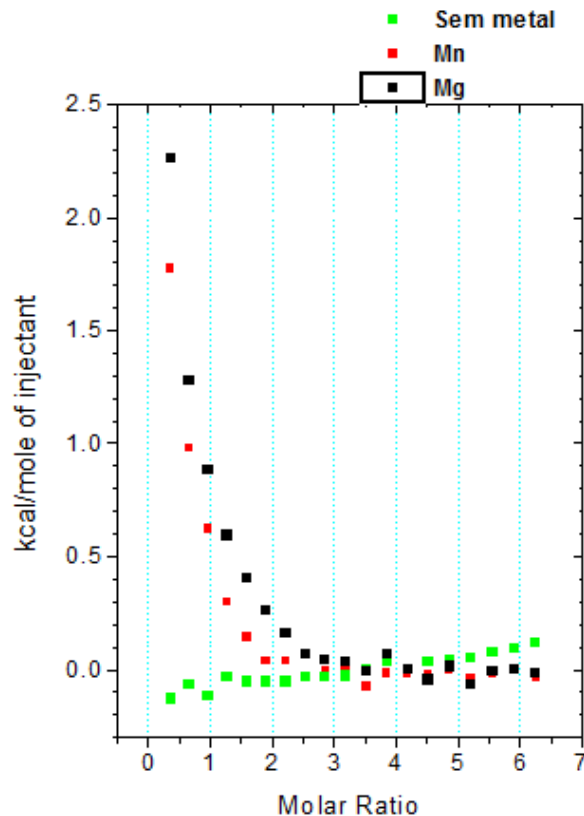


Figura 7 - Perfil de titulação isotérmica da proteína GlnK de *H. seropedicae* com 2-OG na presença de MgATP, MnATP ou com ATP na ausência de metal divalente. 2-OG 3 mM foi titulado contra GlnK 100 μ M na presença de ATP 2 mM. O gráfico mostra a variação de calor por mol de 2-OG injetado em função da razão molar entre o ligante e a proteína.

2.1.4 Regulação da atividade UR da proteína GlnD de *H. seropedicae* por glutamina e 2-OG

A regulação da atividade UR da enzima GlnD já foi caracterizada em outros organismos, como *E. coli* e *R. rubrum* [49] [50]. Nesses organismos, a atividade UR de GlnD é estimulada por glutamina. Ainda, em *H. seropedicae* a atividade UTase de GlnD foi inibida por glutamina [25]. Para verificar o efeito de glutamina sobre a atividade UR de GlnD de *H. seropedicae*, a desuridililação de GlnK-UMP₃ em diferentes concentrações de glutamina foi testada (Figura 8). Os resultados indicam que de fato a atividade UR da enzima GlnD de *H. seropedicae* foi estimulada por glutamina. Na ausência de glutamina nenhuma atividade de desuridililação foi observada, e com a concentração de 2 mM a atividade observada foi máxima.

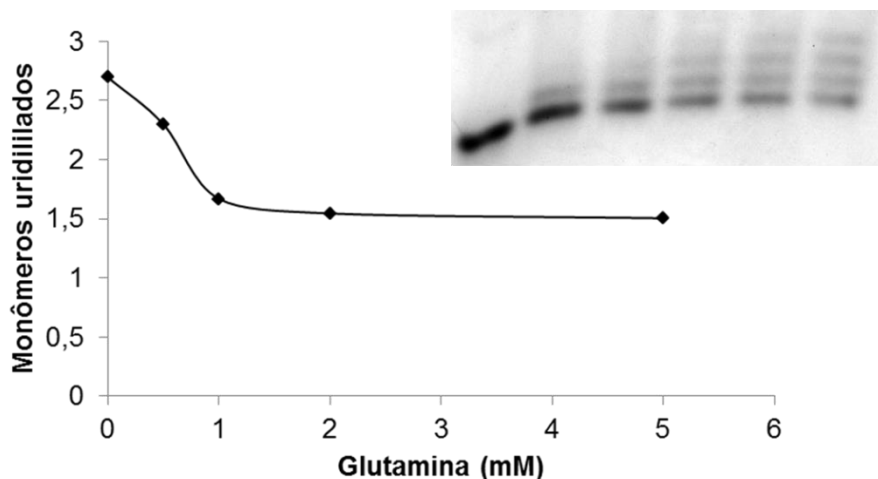


Figura 8 – Efeito da glutamina na desuridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae*. As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μM, ATP 2 mM, e 25 mM MnCl₂ e foram disparadas com GlnD 0,2 μM. Após 10 minutos, as reações foram paradas com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica e a quantidade relativa das bandas correspondentes a cada estado de uridililação foi utilizada para o cálculo de média de monômeros uridililados.

Em *E. coli* além de glutamina, o 2-OG também é requerido para a desuridililação das proteínas PII por GlnD [49]. Por outro lado, em *R. rubrum* a glutamina parece estimular a desuridililação independentemente da presença ou ausência de 2-OG [50]. Para verificar o efeito de 2-OG sobre a desuridililação de GlnK-UMP₃ por GlnD de *H. seropedicae*, a cinética da atividade UR dessa enzima foi testada em diferentes concentrações de 2-OG. Os resultados são mostrados na figura 9. As curvas de tempo foram feitas em diferentes concentrações de 2-OG, todas elas na mesma concentração fixa de glutamina (2 mM). O experimento mostrado na figura 9 mostra que quanto maior a concentração de 2-OG, menor a atividade UR da GlnD de *H. seropedicae*. A partir da concentração de 1 mM de 2-OG a atividade UR de GlnD não foi possível observar desuridililação de GlnK-UMP₃. Essa inibição da desuridililação pode ser consequência da ligação de 2-OG em PII, alterando a conformação do substrato de GlnD, ou pela ligação em GlnD, modulando a atividade diretamente da enzima.

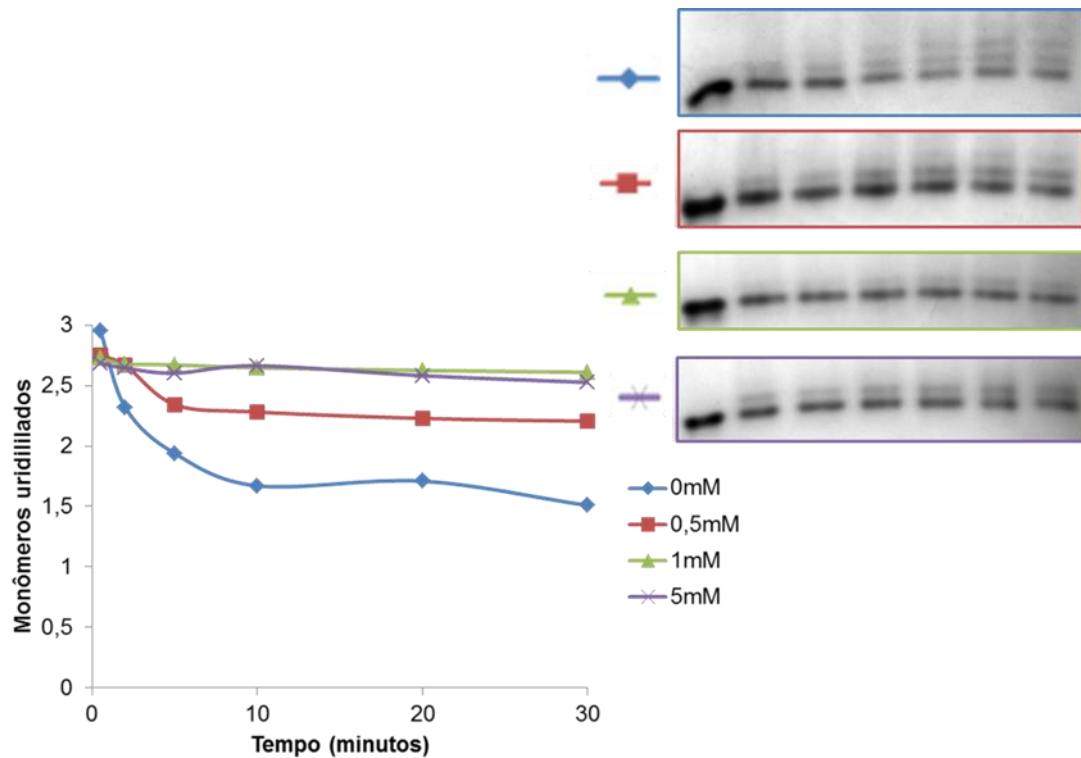


Figura 9 – Efeito do 2-OG na desuridilização da proteína GlnK de *H. seropedicae* (curva de tempo). As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μM, ATP 1 mM, glutamina 2 mM, 25 mM MnCl₂, e 2-OG nas concentrações indicadas, e foram disparadas com GlnD 0,2 μM. Após os tempos 30", 2', 5', 10', 20' e 30', uma alíquota de 10 μL das misturas de reações foi retirada e a reação da alíquota parada com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica e a quantidade relativa das bandas correspondentes a cada estado de uridilização foi utilizada para o cálculo de média de monômeros uridililados.

Como glutamina e 2-OG tem estruturas moleculares semelhantes, consideramos a possibilidade da competição entre 2-OG e glutamina pelo sítio alostérico em GlnD. Para verificar essa hipótese, a cinética da desuridilização de GlnK-UMP₃ por GlnD de *H. seropedicae* foi testada em diferentes concentrações de glutamina, mantendo fixa a concentração de 2-OG. O resultado desse experimento é mostrado na figura 10.

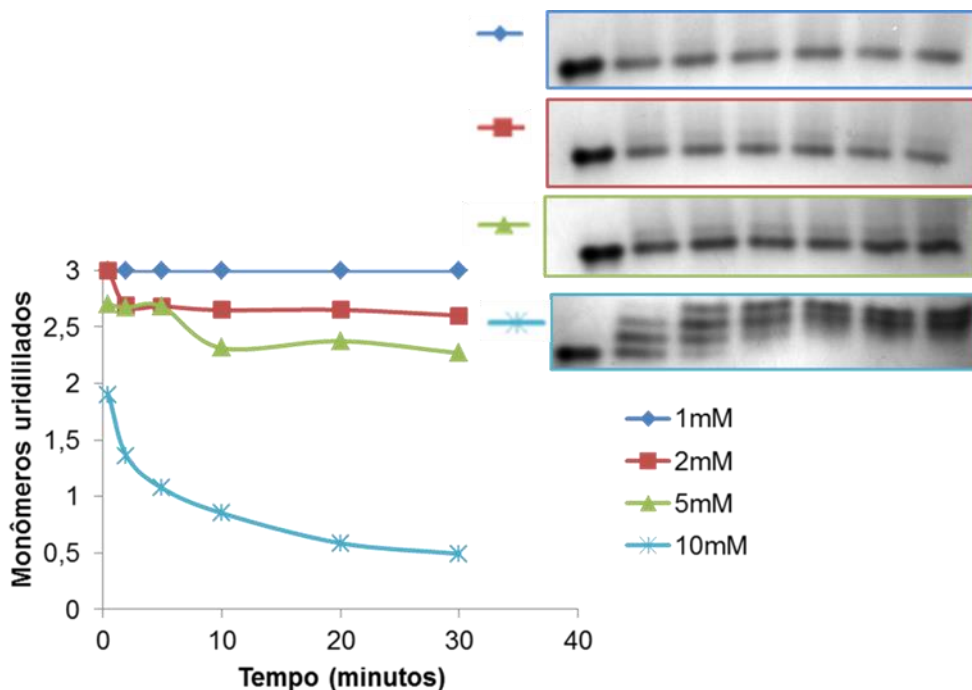


Figura 10 – Efeito da variação de glutamina na desuridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* mantendo fixa a concentração de 2-OG (curva de tempo). As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μ M, ATP 1 mM, 2-OG 2 mM, 25 mM MnCl₂, e glutamina nas concentrações indicadas, e foram disparadas com GlnD 0,2 μ M. Após os tempos 30”, 2’, 5’, 10’, 20’ e 30’, uma alíquota de 10 μ L das misturas de reações foi retirada e a reação da alíquota parada com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica e a quantidade relativa das bandas correspondentes a cada estado de uridililação foi utilizada para o cálculo de média de monômeros uridililados.

Os resultados na figura 10, quando analisados em conjunto com a figura 9, indicam que parece existir uma competição entre glutamina e 2-OG a um sítio alostérico em GlnD. Na figura 9, foi possível observar que na presença de 1 mM de 2-OG a inibição de GlnD foi máxima, quando glutamina estava presente na concentração de 2 mM. No entanto, o resultado na figura 10 mostra que o efeito inibitório de 2-OG foi parcialmente revertido quando a concentração de glutamina era de 5 mM, e inexistente com 10 mM de glutamina.

Os resultados mostrados até aqui fortalecem a hipótese da competição entre esses dois ligantes por ligação direta em GlnD, em vez de ligação de glutamina em GlnD e 2-OG em PII. Uma forma de confirmar essa hipótese seria verificar o efeito inibitório de 2-OG sobre a atividade UR de GlnD na presença de ADP, em vez de ATP. Esse experimento seria informativo porque 2-OG só é capaz de ligar à proteína PII quando ela já está ligada a ATP, não havendo ligação quando a proteína está associada a

ADP [24]. Por isso, caso o efeito de 2-OG mostrado na figura 9 fosse pela ligação direta em GlnD, e não uma consequência da ligação em PII, ele continuaria sendo visto quando a reação fosse realizada na presença de ADP em vez de ATP. Esse experimento está mostrado na figura 11.

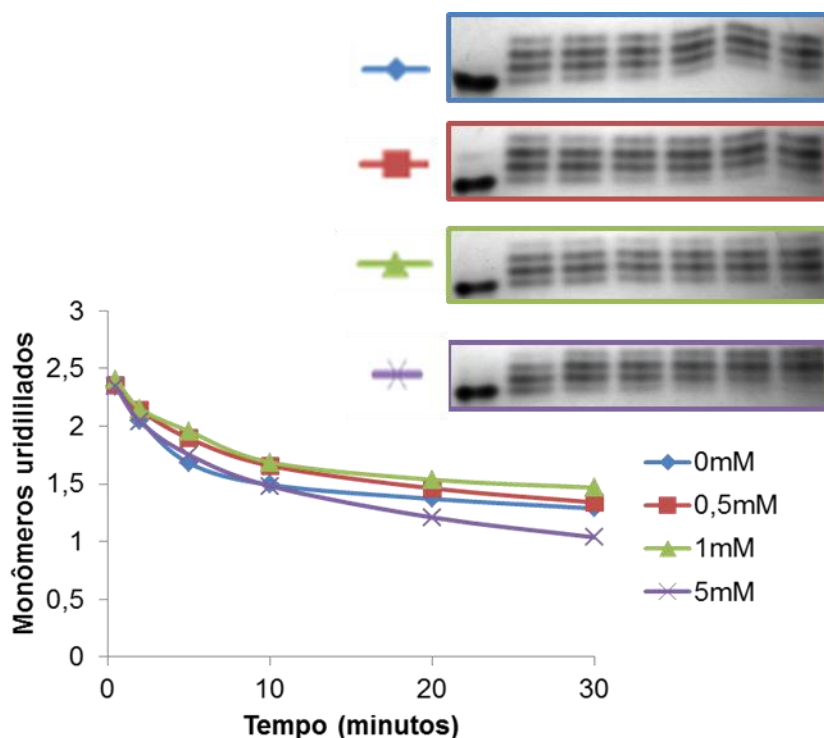


Figura 11 – Efeito da variação de 2-OG na desuridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* mantendo fixa a concentração de glutamina em tampão com ADP (curva de tempo). As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μ M, ADP 1 mM, glutamina 2 mM, 25 mM MnCl₂, e glutamina nas concentrações indicadas, e foram disparadas com GlnD 0,2 μ M. Após os tempos 30'', 2', 5', 10', 20' e 30', uma alíquota de 10 μ L das misturas de reações foi retirada e a reação da alíquota parada com a adição de EDTA 20 mM. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica e a quantidade relativa das bandas correspondentes a cada estado de uridililação foi utilizada para o cálculo de média de monômeros uridililados.

Os resultados mostrados na figura 11 indicam que quando ADP está presente, o 2-OG não é capaz de inibir a atividade UR da proteína GlnD de *H. seropedicae*. Esse resultado contradiz as sugestões de competição entre 2-OG e glutamina pela ligação em GlnD feitas baseadas nas figuras 9 e 10. Esses dados sugerem que de fato a regulação parece envolver um efeito inibitório de 2-OG sobre a reação de desuridililação pela ligação em GlnK-UMP₃ e uma consequente mudança conformacional do substrato de GlnD. Uma outra hipótese seria que para ocorrer a ligação direta de 2-OG com GlnD

seria necessária a participação de ATP, bem como na ligação de 2-OG com GlnK-UMP₃. Novos experimentos serão realizados para investigar se a ligação de 2-OG com ATP ocorre apenas em GlnK-UMP₃ ou também ocorre em GlnD.

Mesmo não sendo possível ainda descrever o mecanismo de resposta de GlnD aos efetores glutamina e 2-OG, nossos resultados indicam que a atividade UR de GlnD é regulada pela razão 2-OG/glutamina. A glutamina é a primeira molécula nitrogenada formada após a assimilação de amônio pela via GS-GOGAT [8]. Dessa forma, um aumento nos níveis intracelulares de glutamina parece ser um importante sinal de um ambiente rico em amônio, que levaria a desuridililação de PII. No entanto, vários avanços recentes têm demonstrado que, além de glutamina, o 2-OG pode ter um papel decisivo na sinalização do nitrogênio [53]. Isso faz sentido, já que a assimilação de amônio para formar glutamina consome 2-OG. De fato, a concentração intracelular de 2-OG de *H. seropedicae* cai após um choque de amônio [24]. Como glutamina é um metabólito essencial em reações biossintéticas, provavelmente seu nível intracelular não pode cair abaixo de um determinado nível, mesmo em ambientes pobres em amônio. Portanto, a sinalização de amônio através da razão 2-OG/glutamina, em vez de apenas os níveis de glutamina, pode ser uma vantagem para a bactéria. Bonatto e colaboradores [25] demonstraram que a uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* é totalmente dependente da presença de 2-OG. Anteriormente, Zhang e colaboradores [35] sugeriram que se a regulação de GlnD de *E. coli* for dependente apenas de glutamina, algum ciclo fútil de uridililação/desuridililação aconteceria *in vivo*. Aqui, nós indicamos um modelo onde, além da regulação por glutamina, a atividade UR da proteína GlnD de *H. seropedicae* é inibida por 2-OG, impedindo o ciclo fútil sugerido por aqueles autores. Nossos resultados sugerem ainda que altas concentrações de 2-OG seriam suficientes para suplantar o efeito estimulatório de glutamina sobre UR, inibindo a desuridililação de PII nessas condições. Esse mecanismo elegante e coordenado de regulação permite que a proteína GlnD de *H. seropedicae* possa integrar sinais moleculares para modular a atividade de PII de acordo com a disponibilidade de amônio através da razão 2-OG/glutamina.

2.2 Ensaio de atividade de versões truncadas de GlnD de *H. seropedicae*

2.2.1 Produção de versões truncadas

Para verificar atividade dos domínios separados e em combinação da proteína GlnD de *H. seropedicae*, foram construídas cinco versões do gene que codifica GlnD. A figura 12 mostra um esquema dos domínios encontrados na proteína GlnD de *H. seropedicae*. Os pontos de truncagem estão mostrados na tabela 1.

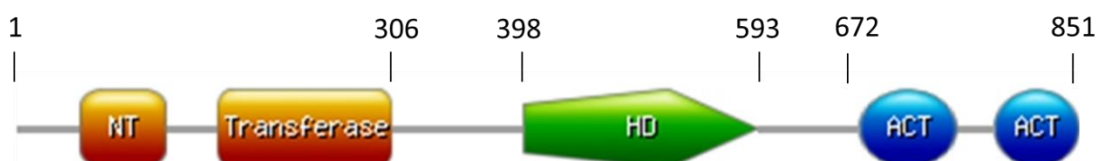


Figura 12 – Esquema dos domínios estruturais da proteína GlnD de *H. seropedicae*. Os números indicam a posição do aminoácido inicial e final de cada domínio.

Construção	Domínio	Aminoácidos
GlnDNT	Transferase	1 - 306
GlnDHD	HD	398 - 593
GlnDΔNT	HD + ACT	398 - 851
GlnDACT	ACT	672 - 851
GlnDΔACT	Transferase + HD	1 - 593

Tabela 1 – Versões truncadas da proteína GlnD de *H. seropedicae*

Para construir as versões truncadas do gene que codifica GlnD, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos durante a amplificação. O resultado da amplificação dos genes está mostrado na figura 13.

Posteriormente, os genes amplificados foram ligados ao vetor pET28a. A ligação foi transformada na estirpe TOP10 de *E. coli* e os clones inoculados em meio líquido. O DNA dos clones foi extraído e analisado por restrição. O resultado da restrição está mostrado na figura 14.

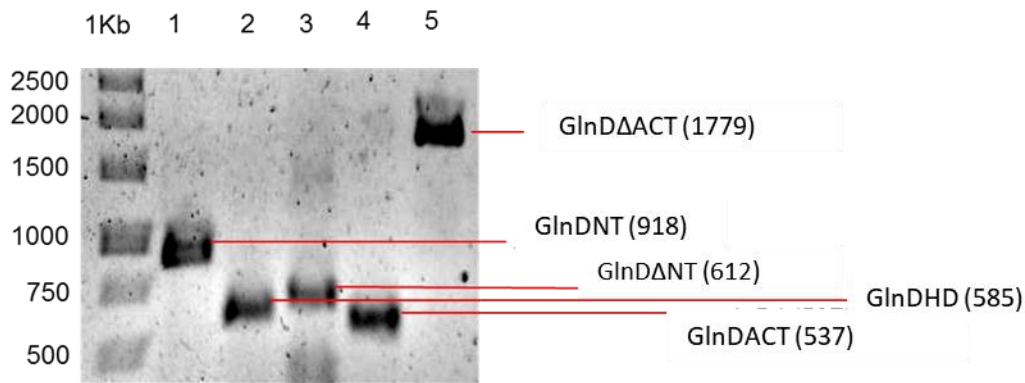


Figura 13 – Eletroforese dos fragmentos de PCR dos genes que codificam as versões truncadas da proteína GlnD de *H. seropedicae*. As reações de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1%, que após a corrida foi corado com brometo de etídeo, e as bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira lane contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Fermentas), com os respectivos tamanhos em número de pares de base indicados. As bandas dos fragmentos também estão indicadas, com os respectivos tamanhos esperados ao lado.

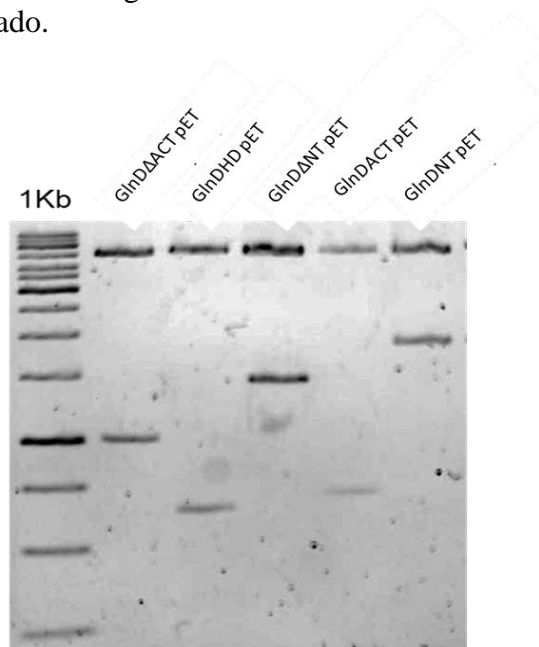


Figura 14 – Confirmação dos clones que expressam as versões truncadas da proteína GlnD por eletroforese de fragmentos de restrição. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas *XbaI* e *BamHI*, que liberam o fragmento clonado mais uma porção flangeadora do vetor. As reações foram aplicadas em gel de agarose 1%, que após a corrida foi corado com brometo de etídeo, e as bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira lane contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Fermentas).

2.2.2 Superexpressão das versões truncadas

Após a confirmação dos clones, os plasmídeos foram transformados na estirpe BL21 de *E. coli* para checar a expressão das proteínas mutantes. O resultado do teste de expressão está mostrado na figura 15.

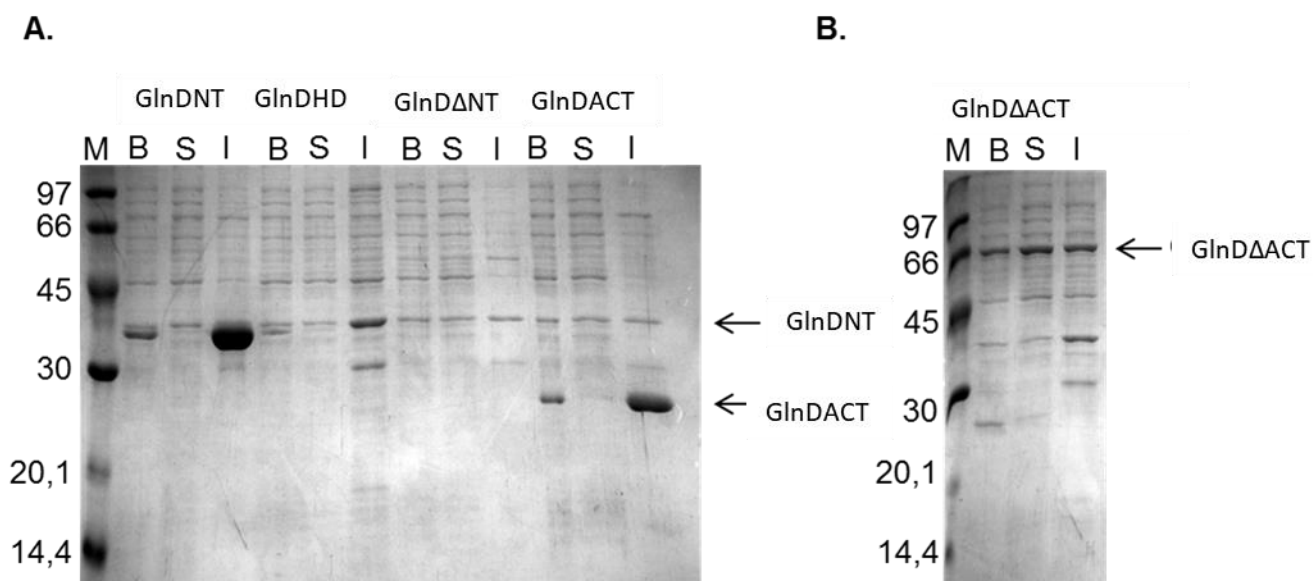


Figura 15 – Teste de expressão dos clones contendo genes para as versões truncadas de GlnD. Após a indução da expressão com IPTG, as células foram sonicadas, as proteínas divididas em extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel, quantificadas, e 5 μ g de proteína total foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. Após corrida do SDS-PAGE, os géis foram corados com Coomassie Blue. As linhas M contém o marcador de massa molecular (GE Lifesciences) com as respectivas massa em KDa. As setas indicam as posições das proteínas que foram superexpressas (GlnDNT, GlnDACT e GlnD Δ ACT). **A.** Extratos brutos (B), Frações solúveis (S) e Frações insolúveis (I) das bactérias contendo os plasmídeos para superexpressão de GlnDNT, GlnDHD, GlnD Δ NT e GlnDACT. **B.** Extrato bruto (B), Fração solúvel (S) e Fração insolúvel (I) da bactéria contendo o plasmídeo para superexpressão de GlnD Δ ACT.

O resultado de superexpressão das proteínas mutantes mostrou que as proteínas GlnDHD e GlnD Δ NT não foram expressas, enquanto que GlnDNT e GlnDACT foram expressas totalmente na fração insolúvel. Para a purificação das mesmas seria necessário realizar testes de solubilização, que serão feitos em estudos futuros.

Na proteína truncada GlnD Δ ACT, cerca de metade da proteína superexpressa foi encontrada na fração solúvel. Por esse motivo, a proteína GlnD Δ ACT foi a primeira versão a ser escolhida para ser purificada e caracterizada.

2.2.3. Atividade UTase e UR de GlnD Δ ACT

A proteína GlnD Δ ACT possui os domínios NT e HD, responsáveis pela uridililação e desuridililação, respectivamente e não possui o domínio regulatório ACT. Com o objetivo de testar a capacidade de uridililação e desuridililação, essas reações foram realizadas por um período de 30 minutos. O resultado está mostrado na figura 16.

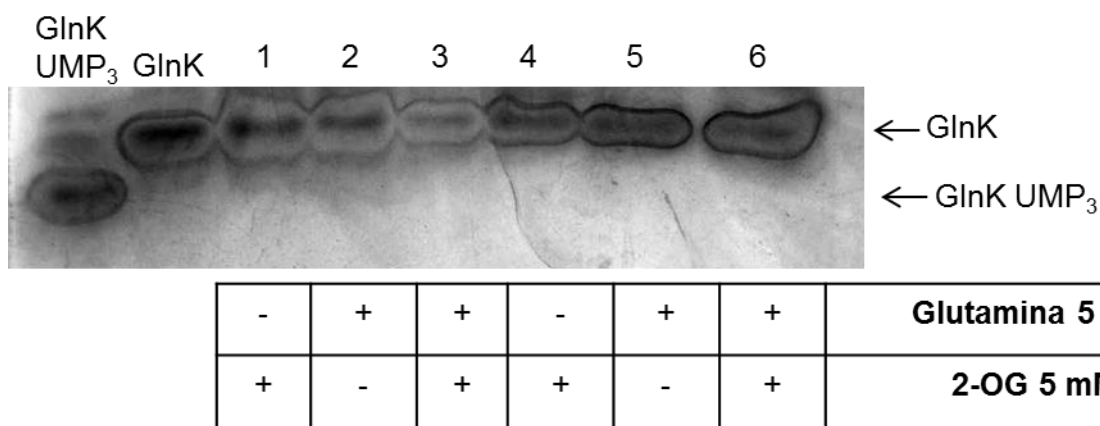


Figura 16 – Teste de atividade de uridililação e desuridililação pela proteína truncada GlnD Δ ACT. As duas primeiras linhas possuem, respectivamente, o padrão de proteína uridililada e o padrão de proteína não uridililada. As linhas identificadas como 1, 2 e 3 correspondem a reações de uridililação, nas quais foi adicionado GlnK não modificada, UTP 1 mM e ATP 0,2 mM. As linhas identificadas com 4, 5 e 6 correspondem a reações de desuridililação, nas quais foi adicionado GlnK-UMP₃ e ATP 1 mM. A tabela abaixo do gel indica se a reação continha glutamina, 2-OG, ou uma combinação dos dois metabólitos. A reação foi iniciada com a adição de GlnD Δ ACT 0,2 μ M. Após 30 minutos, a reação foi parada adicionando EDTA 20mM. Eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue.

No experimento de atividade da proteína GlnD Δ ACT mostrado na figura 16, foi possível observar apenas a banda da proteína não uridililada em todas as condições. Mesmo nas reações de uridililação, na presença de 2-OG e ATP, não foi possível observar nenhuma banda uridililada. Esse resultado indica que talvez essa versão de GlnD tenha atividade UR constitutiva, e nenhuma uridililação aconteceu nas reações 1 – 3. Outra possibilidade seria a perda da regulação, levando a proteína a realizar o ciclo fútil uridililação/desuridililação, que continuaria até todo o UTP adicionado ser consumido. A partir desse ponto a única atividade da enzima seria desuridililação, já que a atividade de uridililação não seria mais possível pela falta de substrato. Para testar essa hipótese, o experimento de uridililação foi repetido com maior concentração de UTP (10 mM) e em tempos mais curtos (3 minutos). Os resultados desse experimento são mostrados na figura 17.

O gel mostrado na figura 17 indica que de fato a proteína GlnD Δ ACT parece realizar o ciclo fútil: desde que tenha quantidade de UTP suficiente para que a uridililação se processe, e se tempos suficientemente curtos de reação forem analisados, é possível verificar a presença de PII uridililada. No caso desse experimento, GlnD Δ ACT uridililou PII com uma eficiência semelhante à de GlnD

inteira, e a única banda visível após o final do experimento era a banda da proteína GlnK totalmente uridililada.

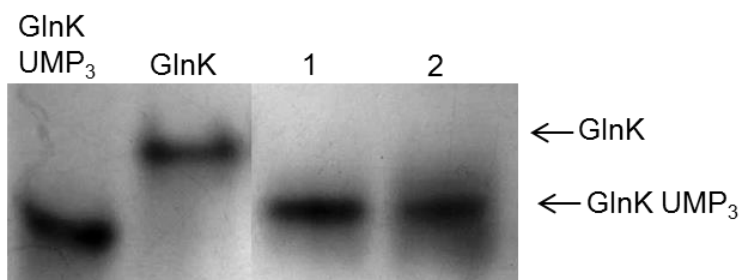


Figura 17 – Uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* em três minutos de reação contendo 5 mM de UTP. As primeiras duas linhas contêm, respectivamente, o padrão de GlnK uridililada e o padrão de GlnK não modificada. A linha identificada como 1 corresponde à reação catalisada pela enzima GlnD selvagem e a linha identificada como 2 à reação catalisada pela enzima truncada GlnDΔACT. A reação foi iniciada com a adição de GlnD (linha 1) ou GlnDΔACT (linha 2). Após três minutos, a reação foi parada adicionando EDTA 20mM. Eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida corado com Coomassie blue.

Para verificar o efeito da concentração de UTP na atividade de GlnDΔACT de uridililação da proteína GlnK, foi realizada uma análise cinética da reação (curva de tempo) em diferentes concentrações de UTP. O resultado está mostrado na figura 18.

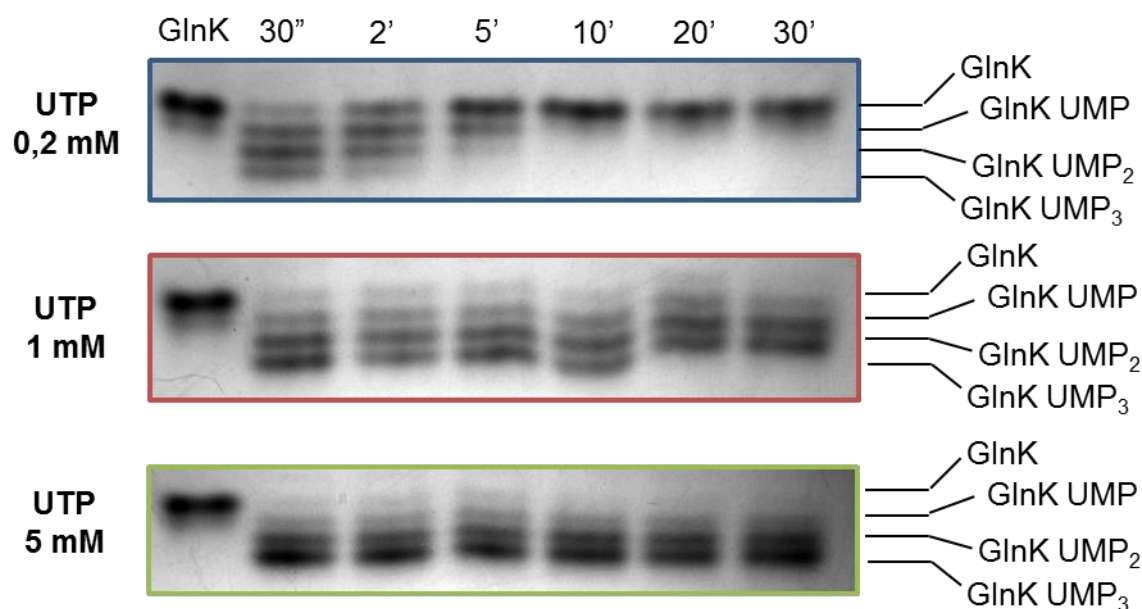


Figura 18 – Efeito da concentração de UTP na uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* pela proteína truncada GlnDΔACT (curva de tempo). As reações continham GlnK 25 μ M, ATP 0,2 mM, 2-OG 5 mM e UTP nas concentrações indicadas, e foram disparadas com GlnDΔACT 0,2 μ M. Em cada tempo indicado no gel, uma alíquota de 10 μ L das misturas de reações foi retirada e a reação da alíquota parada com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas

a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue.

Na figura 18 é possível observar que com 0,2 mM de UTP, a proteína foi inicialmente uridililada (parcialmente) e posteriormente totalmente desuridililada, provavelmente como consequência da exaustão do UTP, levando ao predomínio da atividade UR. Quanto maior era a concentração de UTP, maior e mais duradoura era a uridililação. Esses resultados indicam que a proteína GlnD Δ ACT catalisa o ciclo fútil de uridililação/desuridililação enquanto houver UTP disponível para a uridililação. A partir desse ponto, apenas a atividade UR é detectada. Esse fenômeno explica o resultado encontrado na figura 16, quando apenas a banda não uridililada foi visualizada. Naquele experimento, o UTP provavelmente foi exaurido, restando apenas a atividade UR da enzima.

Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos com GlnD mutantes de *E. coli* [35], onde uma competição das atividades UTase e UR na proteína sem o domínio ACT foi observada, que resultou num ciclo fútil de uridililação e desuridililação.

A proteína GlnD selvagem de *H. seropedicae* só é capaz de uridililar PII na presença de 2-OG [25]. Por isso, os experimentos de uridililação com a proteína truncada GlnD Δ ACT nas figuras 17, 18 e 19 foram feitos na presença de 2-OG. Para verificar se a deleção do domínio ACT da proteína GlnD levaria ao fenótipo da não dependência do 2-OG para uridililação, foram realizados experimentos cinéticos de uridililação em diferentes concentrações de 2-OG. Os resultados estão mostrados na figura 19.

O resultado do experimento mostrado na figura 19 indica que a reação de uridililação pela proteína truncada GlnD Δ ACT é dependente de 2-OG, assim como a proteína GlnD selvagem. Na ausência de 2-OG, não foi possível observar uridililação de GlnK, enquanto que com 1 mM ou 5 mM de 2-OG alguma uridililação foi observada até o tempo de 5 minutos de reação. Esse resultado indica que a sensibilidade ao 2-OG da reação de uridililação catalisada por GlnD de *H. seropedicae* parece não estar relacionada com a ligação desse metabólito ao domínio ACT da enzima, sustentando a ideia de que o efeito de 2-OG está relacionado com a ligação dele à proteína PII.

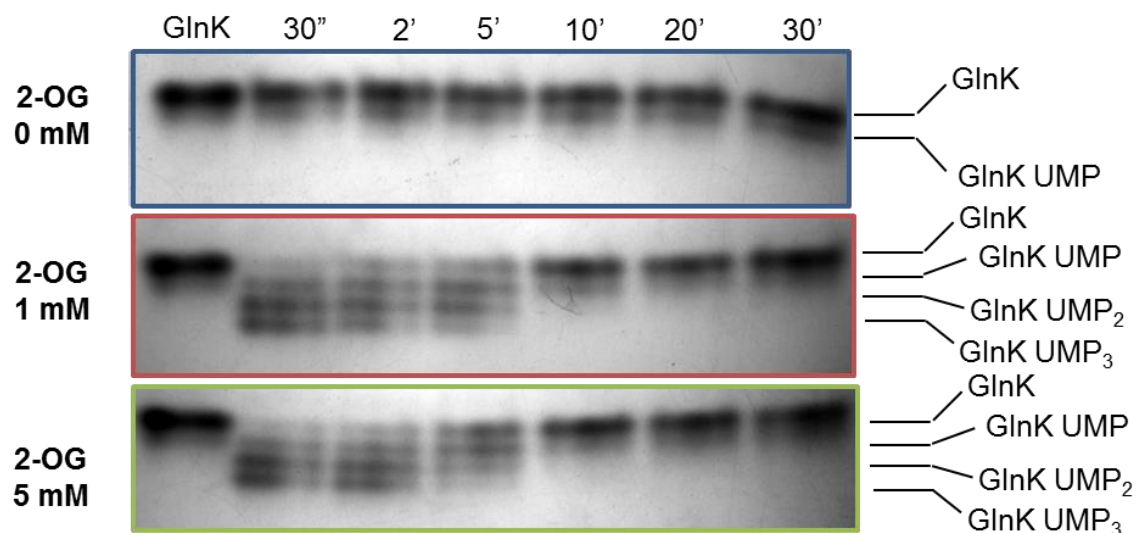


Figura 19 – Efeito da concentração de 2-OG na uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* pela proteína truncada GlnD Δ ACT (curva de tempo). As reações continham GlnK 25 μ M, ATP 0,2 mM, UTP 0,2 mM e 2-OG nas concentrações indicadas, e foram disparadas com GlnD Δ ACT 0,2 μ M. Em cada tempo indicado no gel, uma alíquota de 10 μ L das misturas de reações foi retirada e a reação da alíquota parada com a adição de EDTA 20 mM. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi aplicado em gel de poliácridamida não desnaturante, o qual foi corado com Coomassie Blue.

2.2.4 Atividade UR de GlnD Δ ACT

Para caracterizar a atividade de desuridililação da proteína truncada GlnD Δ ACT, visualizada nos experimento mostrado na figura 16, inicialmente foi testada a dependência de nucleotídeos de adenosina para a reação. A atividade UR de GlnD Δ ACT foi ensaiada na presença de ATP, ADP ou de nenhum nucleotídeo. O resultado desse experimento está mostrado na figura 20.

Os resultados da figura 20 indicam que a enzima GlnD selvagem parece ser mais sensível ao nucleotídeo presente do que a enzima truncada GlnD Δ ACT. Diferente do que acontece com a proteína selvagem, a proteína truncada foi totalmente desuridililada em qualquer condição. O resultado apresentado na figura 20 permite ainda observar que a taxa de desuridililação de GlnD Δ ACT parece ser muito maior do que de GlnD selvagem, uma diferença marcante. Quando o domínio ACT é retirado da proteína, ela parece perder a sensibilidade ao nucleotídeo presente. Essa é uma diferença importante entre a proteína selvagem e a truncada, indicando que talvez GlnD ligue diretamente ATP e/ou ADP. Para confirmar essa hipótese, novos experimentos precisam ser realizados.

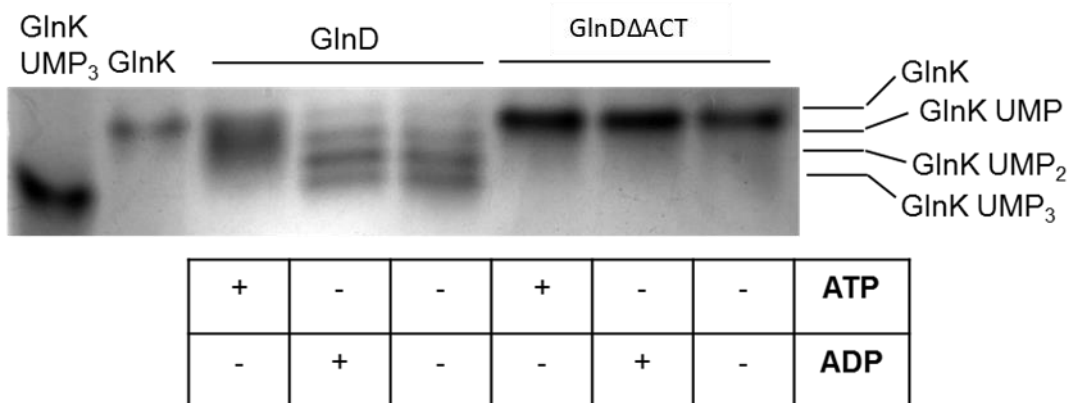


Figura 20 – Dependência dos nucleotídeos de adenosina da reação de desuridilação de GlnK catalisada pela enzima truncada GlnD Δ ACT. As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μ M, Glutamina 5 mM e UTP nas concentrações indicadas, e foram disparadas com GlnD Δ ACT 0,2 μ M. Após dez minutos, as reações foram paradas com a adição de EDTA 20 mM. As duas primeiras linhas possuem, respectivamente, o padrão de proteína uridilada e o padrão de proteína não uridilada. A tabela abaixo do gel indica se a reação continha ATP, ADP, ou nenhum nucleotídeo de adenosina. A reação foi realizada com a enzima GlnD selvagem ou com a versão truncada GlnD Δ ACT, como indicado. Eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue.

Os resultados mostrados nas figuras 9 e 10 deixam claro que a atividade UR da proteína GlnD de *H. seropedicae* é estimulada por glutamina e fortemente inibida por 2-OG. O provável sítio de GlnD sensível a glutamina, que possivelmente poderia concorrer pela ligação de 2-OG, é o domínio ACT. Por isso, é interessante verificar qual é o efeito da adição de 2-OG e glutamina na reação de desuridilação catalisada pela enzima truncada GlnD Δ ACT. Os resultados que acessam essa questão estão mostrados na figura 21.

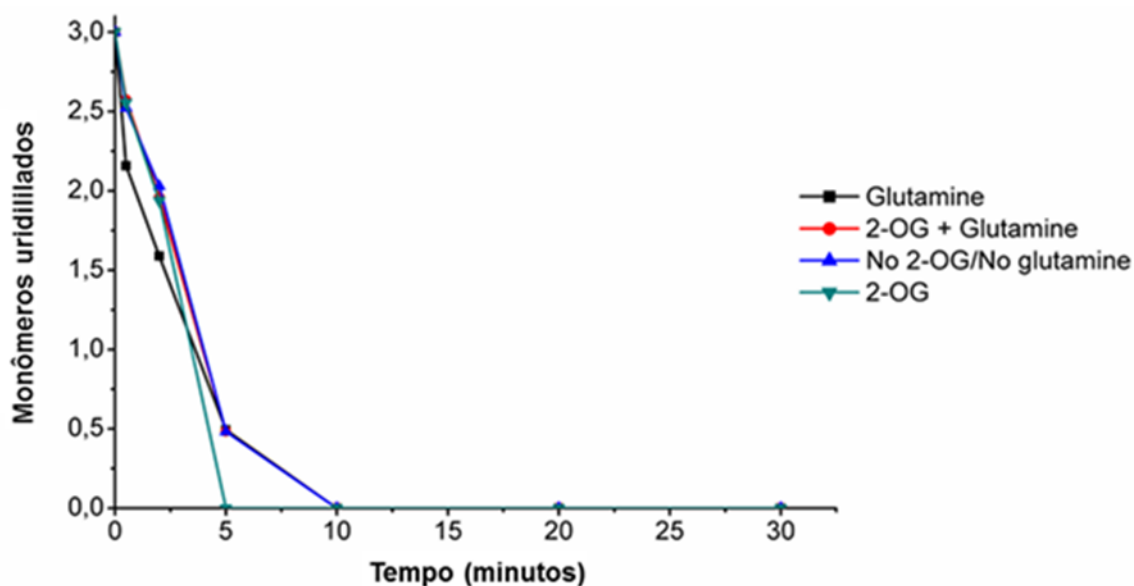


Figura 21 – Cinética de desuridililação de GlnK-UMP₃ na presença ou ausência de glutamina e 2-OG, catalisada por GlnD Δ ACT. As reações continham GlnK-UMP₃ 25 μ M, Glutamina e 2-OG conforme indicado, e foram disparadas com GlnD Δ ACT 0,2 μ M. Após os tempos 30", 2', 5', 10', 20' e 30', foram coletados 10 μ L e as reações foram paradas com a adição de EDTA 20 mM. Eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue. A primeira linha possui o padrão de proteína uridililada.

O resultado da figura 21 é bastante interessante, pois indica que a atividade de desuridililação da enzima truncada GlnD Δ ACT é constitutiva. Ao contrário da proteína selvagem (Figuras 8 e 9), a atividade UR da proteína truncada não é regulada por glutamina nem é inibida por 2-OG.

Com relação à atividade mesmo sem glutamina, é um resultado possível de ser previsto, já que o domínio ACT, retirado na versão GlnD Δ ACT, parece ser o sítio de sensibilidade à glutamina. Resultados com glutamina obtidos por Zhang e colaboradores [35] foram muito semelhantes, onde a GlnD de *E. coli* com mutações no domínio ACT também deixou de apresentar sensibilidade à glutamina. No entanto, a sensibilidade ao 2-OG também foi eliminada da proteína mutante. Esse resultado oferece uma nova evidência para a ligação de 2-OG diretamente à GlnD, permitindo sua regulação através da ligação desse metabólito.

Em resumo, nós mostramos que a proteína GlnD de *H. seropedicae* possui características únicas que a diferem de outras proteínas ortólogas estudadas até o presente momento. O presente trabalho reúne evidências que 2-OG exerce efeito inibitório sobre a desuridililação por ligação direta em GlnD (Figuras 10 e 21), ao mesmo tempo que possui uma forte evidência de que esse efeito sobre a desuridililação

é por sua ligação à proteína PII (Figuras 11 e 20). Para a solução dessa questão, novos experimentos serão realizados. Certamente ajudarão na resolução dessa e de outras questões a análise da atividade das proteínas truncadas GlnDNT, GlnDHD, GlnD Δ NT e GlnDACT.

3. Material e Métodos

3.1. Bactérias e plasmídeos

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados nos experimentos estão listados na tabela 2.

TABELA 2 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Estirpe ou plasmídeo	Fenótipo e/ou genótipo	Referência
Estirpe de <i>E. coli</i>		
BL21 (DE3) pLysS	<i>hsdS gal (λcIts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs)	[54]
Estirpe de <i>H. seropedicae</i>		
SmRI	Sm ^R , Nif ⁺ .	[55]
Plasmídeos		
pEMB200	<i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, Km ^R	[25]
pGH2	<i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET28a, Km ^R	[25]

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C no meio líquido Luria-Bertani (LB) [54], e o meio sólido utilizado foi Luria Bertani Agar (LA) [54]. A estirpe SmRI de *H. seropedicae* foi cultivada em meio NFbHP-malato líquido [56], a 30° C, sob agitação a 130 rpm, por 24 horas. No momento do inóculo foram adicionados 50 mM de solução de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L; KH₂PO₄ 159,5 g/L), e 20 mM de cloreto de amônio. Os meios NFbHP sólido e semi-sólido possuem ágar (15g/L e 1,75 g/L, respectivamente).

3.3. Manipulação do DNA

As reações de ligação, restrição e PCR foram realizadas nas condições específicas para a atividade máxima de cada enzima, de acordo com orientação do fabricante.

A purificação de plasmídeos foi realizada através do método de lise alcalina [54]. Plasmídeos, produtos de PCR e fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta, conforme descrito por Sambrook e colaboradores [54].

3.4. Construção de versões truncadas de GlnD de *H. seropedicae*

Para verificar a atividade de domínios isolados da proteína GlnD de *H. seropedicae*, foi realizada uma análise *in silico* dos domínios da proteína com o auxílio da ferramenta *online* InterPro [57].

Para realizar testes sobre a atividade dos domínios separados, cinco versões diferentes do gene que codifica a enzima GlnD foram construídas, denominadas GlnDNT, GlnDHD, GlnD Δ NT, GlnDACT e GlnD Δ ACT. Os diferentes pontos de truncagem estão mostrados na tabela 2.

Para a verificação da atividade dessas proteínas, oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar os genes que codificam para as proteínas truncadas foram sintetizados. Os oligonucleotídeos iniciadores possuíam sítios de reconhecimento para as enzimas *Nde*I, na extremidade 5', e *Bam*HI, na extremidade 3' para facilitar a clonagem.

3.5. Reação de ligação

Os produtos da PCR foram ligados ao vetor pET28a utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fermentas) de acordo com as orientações do fabricante. A ligação foi transformada na estirpe TOP10 de *E. coli* termocompetentes, e os prováveis clones inoculados em meio líquido. O DNA plasmidial dos clones foi extraído, e analisado por restrição. Os clones foram sequenciados para confirmação da identidade dos insertos e verificação da ausência de mutações pontuais inespecíficas.

3.6. Expressão e purificação das proteínas GlnK, GlnD e GlnD Δ ACT de *H. seropedicae*

Os plasmídeos de expressão contendo os genes que codificam as proteínas a serem superexpressas foram transformados em *E. coli* BL21 e a expressão foi induzida com adição de 0,5 mM de IPTG. Para a proteína GlnK, a superexpressão ocorreu por 3 horas a 30°C. Para as proteínas GlnD e GlnD Δ ACT, a superexpressão foi realizada por 16 horas a 16°C.

Após ser superexpressa, a proteína GlnK foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica Hi-Trap Heparina (GE – healthcare) conforme descrito anteriormente [58]. As proteínas GlnD e GlnD Δ ACT foram purificadas utilizando uma coluna de afinidade Hi-Trap Chelating HP (GE – healthcare) carregada com níquel como descrito por Bonatto e colaboradores [25].

3.7. Obtenção das formas totalmente uridililadas de GlnK de *H. seropedicae*

A uridililação das proteínas PII foi feita como descrito previamente [24]. O sistema de uridililação continha ATP (200 μ M), 2-OG (5 mM), UTP (5 mM), GlnK (300 μ M) e GlnD (11 μ M) no tampão de uridililação (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, e 25 mM MgCl₂). As reações foram iniciadas com a adição de UTP e paradas por aquecimento a 70°C por 15 minutos. Em cada reação, a uridililação foi avaliada através da eletroforese em gel não desnaturante. Para a purificação das proteínas PII uridililadas, a reação total foi aplicada em uma coluna Hi-Trap-Chealating carregada com Ni²⁺, e a proteína PII-UMP₃ recuperada da coluna foi extensivamente dialisada contra um tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH8,0, 50 mM NaCl e 10 mM MgCl₂.

3.8. Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método de Bradford [59]. Albumina bovina foi utilizada como padrão. Alternativamente, as proteínas purificadas foram quantificadas pela absorbância em 280 nm utilizando o equipamento Nanodrop (Thermofisher).

3.9. Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes

As amostras proteicas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) [60]. As proteínas foram visualizadas após a coloração por Coomassie Blue [60].

3.10. Eletroforese de proteínas em condições não desnaturantes

A separação de proteínas por eletroforese nativa foi realizada em um sistema contendo acrilamida 9%, 450 mM tris pH 8.9, 0,025% Nonidet, 0,1% persulfato de amônio, e TEMED, conforme descrito anteriormente [61]. As eletroforeses foram corridas a 100V por 4 h, em tampão Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM, utilizando sistema de minigel BioRad de acordo com as orientações do fabricante.

3.11. Reações de uridililação e desuridililação

As reações de uridililação e desuridililação foram feitas com GlnK/GlnK-UMP₃ (25 µmol/L) em tampão de reação (100 mM Tris-Cl pH7,5; 100 mM KCl e 25 mM de MgCl₂ ou MnCl₂, conforme indicado). As reações de uridililação continham ainda UTP 1 mM ou na concentração indicada no experimento. Nucleotídeos (ATP ou ADP), glutamina e 2-OG foram adicionados conforme indicado em cada experimento. As reações foram pré-incubadas por 10 minutos a 37°C e disparadas com GlnD ou GlnDΔACT (10 µM). As reações foram interrompidas com EDTA 20 mM. Para a verificação do estado de uridililação da proteína GlnK, as reações foram aplicadas em gel de eletroforese nativo corados com corante Coomassie Blue.

3.12. Quantificação das bandas

A quantificação das bandas proteicas visualizadas no gel foi feita com auxílio do programa ImageJ [62]. Os resultados foram plotados em gráficos expressos em quantidade relativa de monômeros de GlnK uridililados.

4. Abreviações

2-OG	2-oxoglutarato
ACT	Domínio C-terminal de GlnD
ADP	Adenosina difosfato
AIA	Ácido-indol-acético
ATP	Adenosina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GDH	Glutamato desidrogenase
Gln	Aminoácido glutamina
Glu	Aminoácido glutamato
GOGAT	Glutamina oxoglutarato aminotransferase
GS	Glutamina sintetase
HD	Domínio central de GlnD
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
kDa	Kilodalton
LA	Meio de cultura Luria-Bertani com ágar
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
Lys	Aminoácido lisina
NFbHP	Meio de cultura Nitrogen-Free
NT	Domínio N-terminal nucleotidotransferase de GlnD
Ntr	Nitrogen regulation system
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Aminoácido serina

SOB	Meio de cultura Super Optimal Broth
SOC	Meio de cultura Super Optimal Broth com glicose
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tyr	Aminoácido tirosina
UMP	Uridina monofosfato
UR	Uridilil-removedora
UTase	Uridilil-transferase
UTP	Uridina trifosfato

5. Referências Bibliográficas:

- 1 Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L & Dobereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 86–93.
- 2 Olivares FL, James EK, Baldani JI & Döbereiner J (1997) Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.* **135**, 723–737.
- 3 Dartora J, Guimarães VF, Marini D & Sander G (2013) Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* **17**, 1023–1029.
- 4 Pankievicz VCS, Do Amaral FP, Santos KFDN, Agtuca B, Xu Y, Schueller MJ, Arisi ACM, Steffens MBR, De Souza EM, Pedrosa FO, Stacey G & Ferrieri RA (2015) Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *Plant J.* **81**, 907–919.
- 5 Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R & Bottini R (1998) 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.* **24**, 7–11.
- 6 El-Desouk Radwan TES, Mohamed ZK & Reis VM (2004) Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **39**, 987–994.
- 7 Dotto AP, Lana MC, Steiner F & Frandoloso JF (2010) Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. *Rev. Bras. Ciências Agrárias - Brazilian J. Agric. Sci.* **5**, 376–382.
- 8 Merrick MJ & Edwards R a (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 604–622.
- 9 Helling RB (1998) Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 4571–4575.
- 10 Nelson DL & Cox MM (2013) *Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.*
- 11 Arcondéguy T, Jack R, Merrick M & Arconde T (2001) PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 80–105.
- 12 Jiang P & Ninfa AJ (2007) *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge *in vitro*. *Biochemistry* **46**, 12979–12996.
- 13 Stadtman ER (2001) The story of glutamine synthetase regulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 44357–44364.
- 14 Huergo LF, Chandra G & Merrick M (2013) PII signal transduction proteins: Nitrogen regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 251–283.
- 15 Benelli EM, Souza EM, Funayama S & Rigo LU (1997) Evidence for two possible *glnB* -type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **179**, 4623–4626.
- 16 Noindorf L, Rego FGM, Baura VA, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Rigo LU, Souza EM, Steffens MBR, Pedrosa FO & Chubatsu LS (2006) Characterization of the *orf1 glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. *Arch. Microbiol.* **185**, 55–62.
- 17 van Heeswijk WC, Stegeman B, Hoving S, Molenaar D, Kahn D & Westerhoff H V (1995) An additional PII in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**, 153–157.
- 18 Atkinson MR & Ninfa AJ (1998) Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**, 431–447.
- 19 Benelli EM, Buck M, Polikarpov I, De Souza EM, Cruz LM & Pedrosa FO (2002) *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3296–3303.
- 20 Carr PD, Cheah E, Suffolk PM, Vasudevan SG, Dixon NE & Ollis DL (1996) X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **52**, 93–104.
- 21 Radchenko M & Merrick M (2011) The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 189–194.
- 22 Merrick M (2015) Post-translational modification of PII signal transduction proteins. *Front. Microbiol.* **5**, 763.
- 23 Gosztolai A, Schumacher J, Behrends V, Bundy JG, Heydenreich F, Bennett MH, Buck M & Barahona M (2017) GlnK Facilitates the Dynamic Regulation of Bacterial Nitrogen Assimilation. *Biophys. J.* **112**, 2219–2230.
- 24 Oliveira MAS, Gerhardt ECM, Huergo LF, Souza EM, Pedrosa FO & Chubatsu LS (2015) 2-Oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. *FEBS J.* **282**, 4797–4809.

- 25 Bonatto AC, Couto GH, Souza EM, Araújo LM, Pedrosa FO, Noindorf L & Benelli EM (2007) Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. *Protein Expr. Purif.* **55**, 293–299.
- 26 Palanca C & Rubio V (2017) Effects of T-loop modification on the PII-signalling protein: structure of uridylylated *Escherichia coli* GlnB bound to ATP. *Environ. Microbiol. Rep.* **9**, 290–299.
- 27 Bonatto AC, Souza EM, Oliveira MAS, Monteiro RA, Chubatsu LS, Huergo LF & Pedrosa FO (2012) Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro. *Arch. Microbiol.* **194**, 643–652.
- 28 Atkinson MR, Kamberov ES, Weiss RL & Ninfa AJ (1994) Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.* **269**, 28288–28293.
- 29 Kan CC, Chung TY, Juo YA & Hsieh MH (2015) Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. *BMC Genomics* **16**, 731.
- 30 Brown MS, Segal A & Stadtman ER (1971) Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII-regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2949–2953.
- 31 Mangum JH, Magni G & Stadtman ER (1973) Regulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation by the enzymatic uridylylation and deuridylylation of the PII regulatory protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 514–525.
- 32 Adler SP, Purich D & Stadtman ER (1975) Control of *Escherichia Synthetase*. *Cell* **250**, 6264–6272.
- 33 Aravind L & Koonin E V. (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 469–472.
- 34 Aravind L & Koonin E V. (1999) Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J. Mol. Biol.* **287**, 1023–1040.
- 35 Zhang Y, Pohlmann EL, Serate J, Conrad MC & Roberts GP (2010) Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. *J. Bacteriol.* **192**, 2711–2721.
- 36 Yurgel SN & Kahn ML (2008) A mutant GlnD nitrogen sensor protein leads to a nitrogen-fixing but ineffective *Sinorhizobium meliloti* symbiosis with alfafa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18958–18963.
- 37 Strösser J, Lüdke A, Schaffer S, Krämer R & Burkovski A (2004) Regulation of GlnK activity: Modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **54**, 132–147.
- 38 Aravind L & Koonin E V (1999) DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1609–18.
- 39 Chipman DM & Shaanan B (2001) The ACT domain family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 694–700.
- 40 Grant GA (2006) The ACT domain: A small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *J. Biol. Chem.* **281**, 33825–33829.
- 41 Tøndervik A, Torgersen HR, Botnmark HK & Strøm AR (2006) Transposon mutations in the 5' end of *glnD*, the gene for a nitrogen regulatory sensor, that suppress the osmosensitive phenotype caused by otsBA lesions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 4218–4226.
- 42 Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, Bender RA & Kustu S (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14674–14679.
- 43 Hoch JA (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170.
- 44 Kustu S, Santero E, Keener J, Popham D & Weiss D (1989) Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**, 367–376.
- 45 Moretfl E & Segovia2t L (1993) The r54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**, 6067–6074.
- 46 Reitzer L (2003) Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 155–176.
- 47 Wasseem R, de Souza EM, Yates MG, Pedrosa FO & Buck M (2000) Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. *Mol. Microbiol.* **35**, 756–764.
- 48 Dixon R & Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 621–631.
- 49 Jiang P, Peliska JA & Ninfa AJ (1998) Enzymological characterization of the signal-transducing

- uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry* **37**, 12782–12794.
- 50 Jonsson A & Nordlund S (2007) *In vitro* studies of the uridylylation of the three PII protein paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: The transferase activity of *R. rubrum* GlnD is regulated by α -ketoglutarate and divalent cations but not by glutamine. *J. Bacteriol.* **189**, 3471–3478.
- 51 Fokina O, Chellamuthu V-R, Forchhammer K & Zeth K (2010) Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19760–19765.
- 52 Truan D, Huergo LF, Chubatsu LS, Merrick M, Li XD & Winkler FK (2010) A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. *J. Mol. Biol.* **400**, 531–539.
- 53 Huergo LF & Dixon R (2015) The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**, 419–35.
- 54 Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press.
- 55 Souza EM, Pedrosa FO, Rigo LU, Machado HB & Yates MG (2000) Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: Role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. *Microbiology* **146**, 1407–1418.
- 56 Klassen G, Pedrosa FO, Souza EM, Funayama S & Rigo LU (1997) Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Can. J. Microbiol.* **43**, 887–891.
- 57 Mitchell A, Chang HY, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, Lopez R, McAnulla C, McMenamin C, Nuka G, Pesseat S, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Rato C, Yong SY, Bateman A, Punta M, Attwood TK, Sigrist CJA, Redaschi N, Rivoire C, Xenarios I, Kahn D, Guyot D, Bork P, Letunic I, Gough J, Oates M, Haft D, Huang H, Natale DA, Wu CH, Orengo C, Sillitoe I, Mi H, Thomas PD & Finn RD (2015) The InterPro protein families database: The classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res.* **43**, D213–D221.
- 58 Moure VR, Razzera G, Araújo LM, Oliveira MAS, Gerhardt ECM, Müller-Santos M, Almeida F, Pedrosa FO, Valente AP, Souza EM & Huergo LF (2012) Heat stability of proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. *Protein Expr. Purif.* **81**, 83–88.
- 59 Bradford MM (1976) Determinacion de proteínas: método de Bradford. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- 60 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 61 Forchhammer K & De Marsac NT (1994) The P(II) protein in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.* **176**, 84–91.
- 62 Abramoff MD, Magalhães PJ & Ram SJ (2005) Image processing with ImageJ Part II. *Biophotonics Int.* **11**, 36–43.