

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

LARISSA FONSECA TOMAZINI

REGULAÇÃO DO ESTADO DE MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA
GLUTAMINA SINTETASE DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Maringá

2020

LARISSA FONSECA TOMAZINI

REGULAÇÃO DO ESTADO DE MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA
GLUTAMINA SINTETASE 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

2020

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

Tomazini, Larissa Fonseca

T655r Regulação do estado de modificação pós-traducional da glutamina sintetase de *Herbaspirillum seropedicae*/ Larissa Fonseca Tomazini. -- Maringá, 2020.

49 f. il. color., figs.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas(Biologia Celular), 2020.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio. 2. Biologia Molecular. 3. Bioquímica Molecular. 4. Vias metabólicas de Procariotos. I. Oliveira, Marco Aurélio Schuler de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas(Biologia Celular). III. Título.

CDD 22. ED.572.8

Jane Lessa Monção CRB 9/1173

LARISSA FONSECA TOMAZINI

REGULAÇÃO DO ESTADO DE MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA
GLUTAMINA SINTETASE 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: 20.1.07.2020

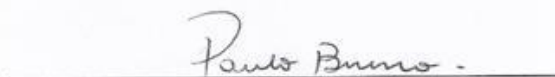
BANCA EXAMINADORA



Prof. Marco Aurélio Schüler de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Rogério Marchiosi
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Paulo Sérgio Alves Bueno
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

LARISSA FONSECA TOMAZINI nasceu em Mauá/SP, em 29 de agosto de 1996. Desde os 5 anos de idade já tinha o sonho de um dia se tornar cientista, de forma que sempre que ia no quintal de sua avó, colhia diversas flores e ervas, afim de fazer remédios e perfumes para a família toda. Aos 8 anos se mudou de Mauá para Maringá/PR, onde terminou o ensino fundamental e iniciou o médio, sempre em escola pública. No terceiro ano do ensino médio, já tinha certeza que queria seguir carreira em áreas que envolviam biologia e química, e se inscreveu para uma bolsa de um curso de biotecnologia no SENAI. Lá se apaixonou pela bioquímica e biologia molecular, e descobriu que era aquilo que ela gostaria de estudar/pesquisar pelo resto de sua vida. Prestou vestibular no final daquele ano para Bioquímica, na Universidade Estadual de Maringá, e no outro ano (2014) iniciou seus estudos. Se formou em Técnica em Biotecnologia em (2015) e em Bacharel em Bioquímica em (2017), ano em que resolveu que queria se tornar professora/pesquisadora, e por isso resolveu realizar a prova de mestrado do programa de Biologia Celular e Molecular na Universidade Estadual de Maringá, e em 2018 iniciou o curso de Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela minha vida, e por me ajudar a superar todos os obstáculos ao longo do mestrado.

Ao meu orientador Marco Aurélio, pela oportunidade, confiança, dedicação e incentivo diário que me fez querer aperfeiçoar e aprender cada vez mais.

Aos meus pais, Anselmo e Creunice e minha irmã Vanessa. Pelo amor incondicional, apoio, incentivo e confiança.

Ao Rodrigo, pela compreensão e companheirismo ao longo destes anos.

À todos os professores e técnicos do Departamento de Bioquímica, por todos os ensinamentos e por serem sempre atenciosos.

Agradeço aos meus queridos companheiros do laboratório 015: Ana, Amanda, Eduardão, Josi, Eduardinho, Lorena, Nunis e professor Wanderley, com os quais eu pude aprender muito sobre bioquímica e biologia molecular, me divertir com memes, e tomar café dos senhores aposentados.

Aos meus amigos, em especial Isabela, que esteve do meu lado nos momentos de sucesso e fracasso, e que sempre me deu incentivo para continuar.

Ao COMCAP, por todos os equipamentos disponíveis para uso comum dos estudantes dessa Universidade, e todos os técnicos, sempre solícitos e dispostos a nós ajudar.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido ao periódico *BBA – Protein and Proteomics* com modificações para facilitar o entendimento do texto.

Larissa Fonseca Tomazini, Marco Aurélio Schuler de Oliveira. Regulação do estado de modificação pós-traducional da glutamina sintetase de *Herbaspirillum seropedicae*.

**REGULAÇÃO DO ESTADO DE MODIFICAÇÃO
PÓS-TRADUCIONAL DA GLUTAMINA SINTETASE
DE *Herbaspirillum seropedicae*.**

Tomazini LF, Oliveira MAS

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

RESUMO GERAL

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio, capaz de colonizar tecidos interno de gramíneas economicamente relevantes. A *H. seropedicae* tem potencial como inoculante biofertilizante pois é capaz de promover o crescimento de plantas, e o nitrogênio fixado por ela é incorporado na biomassa da planta hospedeira. Dessa forma o metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae* desperta interesse.

A principal fonte de nitrogênio para a maioria das bactérias é o amônio. A assimilação dessa molécula consiste na sua condensação com o esqueleto carbônico do 2-oxoglutarato (2-OG) para formar glutamato e glutamina os quais, por sua vez, irão servir como doadores de grupo amino para reações biossintéticas da célula. A via mais importante de assimilação de amônio possui duas enzimas: glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Na primeira etapa dessa via, GS catalisa a condensação do amônio à uma molécula de glutamato para formar glutamina. Na segunda etapa da assimilação, a glutamina formada por GS sofre uma transaminação com 2-OG para formar duas moléculas de glutamato.

O fluxo metabólico através da via GS/GOGAT é fortemente regulado, sendo GS o principal alvo de regulação. A regulação da enzima GS pode sofrer regulação alostérica ou regulação pós-traducional, através de uma adenililação reversível. A enzima responsável por determinar o estado de modificação pós-traducional de GS (adenililada ou não modificada) é conhecida como GlnE (ou ATase), uma enzima bifuncional capaz de adenililar (atividade AT) e desadenililar (atividade AR) a GS. A escolha entre a ativação da atividade AT ou AR depende de um sistema molecular complexo conhecido como Ntr. Embora diferentes bactérias compartilhem a maioria das proteínas de assimilação de nitrogênio e do sistema Ntr, o exato mecanismo de regulação tem uma considerável variação entre diferentes bactérias.

Entre as proteínas mais importantes do sistema Ntr estão as proteínas da família PII, que funcionam como proteínas regulatórias transdutoras de sinal. Nas cascatas regulatórias de GS descritas até agora, a disponibilidade ambiental de nitrogênio é transduzida para GlnE pelas proteínas PII. *H. seropedicae* possui duas

proteínas da família PII, GlnB e GlnK, e o papel dessas proteínas na regulação de GS deste organismo ainda não foi esclarecido até o presente momento.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a GS de *H. seropedicae* parece ser inativada por modificação pós-traducional em resposta ao amônio, como em outros organismos. Para caracterizar a regulação do estado de modificação pós-traducional da GS de *H. seropedicae*, nós utilizamos uma abordagem de atividade *in vitro*. Nossos resultados mostraram que a cascata regulatória da assimilação de amônio dessa bactéria tem algumas características únicas, nunca descritas na literatura que descreve os mecanismos regulatórios dos sistemas ortólogos. A GlnE de *H. seropedicae* adenilila a GS quando os níveis de 2-OG são baixos, o que leva a uma diminuição da atividade assimilatória de GS. Esse efeito de 2-OG é mediado pelas proteínas PII. Em baixas concentrações de amônio, a GlnE desadenilila GS. A desadenililação é estimulada por ATP. Os resultados indicam, ainda, que a forma não adenililada de GS é inibida alostericamente por tirosina, treonina e glutamina. O mecanismo de regulação aqui descrito permite a integração de sinais de disponibilidade de nitrogênio e carbono, e também da razão ATP/ADP. Assim, o estado de modificação pós-traducional de GS de *H. seropedicae* é regulado finamente de acordo com as condições ambientais encontradas pela bactéria.

RESUMO

A via de assimilação de amônio em bactérias é normalmente regulada através da adenililação reversível da enzima glutamina sintetase (GS). Ambas atividades, adenilil transferase (ATase) e adenilil removedora (AR) de GS são catalisadas pela mesma enzima bifuncional, chamada GlnE. Aqui nós caracterizamos *in vitro* a regulação da enzima GlnE de *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria fixadora de nitrogênio. Os resultados indicaram que duas proteínas PII de *H. seropedicae*, GlnB e GlnK, podem estimular a atividade ATase de GlnE, embora não sejam estritamente necessárias. Na presença de PII, a atividade ATase foi inibida por 2-oxoglutarato. Além disso, ATP parece inibir a atividade ATase de GlnE. A atividade AR de *H. seropedicae*, por sua vez, foi ativada por ATP e inibida por ADP e não foi estimulada pelas formas uridililadas da proteína PII, diferente do mecanismo reportado para proteínas GlnE ortólogas. Os detalhes a respeito da regulação da GlnE de *H. seropedicae* são discutidos.

PALAVRAS-CHAVE: Glutamina Sintetase, GlnE, *Herbaspirillum seropedicae*.

ABSTRACT

The ammonium assimilation pathway in bacteria is usually regulated through the reversible adenylation of the glutamine synthetase enzyme (GS). Both activities, adenylyl transferase (ATase) and adenylyl removing (AR) of GS are catalyzed by the same bifunctional enzyme, so called GlnE. Here we *in vitro* characterize the regulation of GlnE of *Herbaspirillum seropedicae*, a nitrogen fixing bacterium. The results indicate that the *H. seropedicae* PII proteins, GlnB and GlnK, are capable to stimulate the ATase activity of GlnE, though are not strictly necessary. In the presence of the PII proteins, the ATase activity was inhibited by 2-oxoglutarate. Furthermore, ATP seems to inhibit the GlnE ATase activity. The AR activity of *H. seropedicae* GlnE, on its turn, is activated by ATP and inhibited by ADP, and was not stimulated by the uridylylated forms of the PII proteins, diverse from other reported GlnE orthologues. The details regarding the regulation of *H. seropedicae* GlnE are discussed.

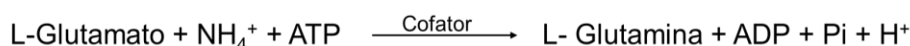
Keyword: Glutamine Synthetase, GlnE, *Herbaspirillum seropedicae*.

1. INTRODUÇÃO

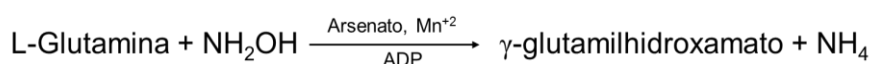
A enzima Glutamina Sintetase (EC 6.3.1.2) catalisa a primeira reação da via de assimilação de amônio em bactérias [1]. A catálise de Glutamina Sintetase (GS) consiste na condensação de glutamato e amônio formando glutamina, em uma reação dependente de ATP [2]. A glutamina formada por GS pode transferir seu grupo amina para o 2-oxoglutarato (2-OG) para formar duas moléculas de glutamato, em uma reação catalisada pela enzima glutamato sintase (GOGAT). Portanto, a reação geral da via GS/GOGAT consiste na formação de glutamato a partir de amônio e 2-OG, com hidrólise de ATP e oxidação de NADPH. A glutamina e o glutamato formados nessas reações servem como doadores de nitrogênio para muitas reações biossintéticas. O fluxo metabólico através do GS/GOGAT é fortemente regulado, para evitar desperdícios improdutivos de ATP e para manter a glutamina intracelular em níveis adequados [3].

A atividade da enzima GS pode ser avaliada *in vitro* através de duas reações distintas: biossintética e γ -glutamil transferase.

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



Na reação de γ -glutamil transferase, a enzima catalisa a transferência do grupamento γ -glutamil da glutamina para formar γ -glutamilhdroxamato [4], de acordo com a reação descrita a seguir:



Eisenberg e colaboradores (2000) [2] citam os primeiros estudos desta enzima, cujos resultados demonstraram um mecanismo de reação de duas etapas. Na primeira etapa ocorre a formação do intermediário γ -glutamil fosfato, o qual, na segunda etapa, é atacado pelo amônio, liberando fosfato livre para produzir glutamina.

Se o amônio for substituído por hidroxilamina (NH_2OH), o produto da reação será o γ -glutamilhdroxamato, um produto quantificável por espectrofotometria [5].

Existem três classes de GS, chamadas GSI, GSII e GSIII. A GSI, objeto do presente trabalho, é uma proteína multimérica, compreendendo 12 subunidades idênticas, formadas a partir de dois anéis hexaméricos unidos face a face, com 12 sítios ativos entre os monômeros [2].

Além de uma regulação alostérica por Adenosina monofosfato (AMP), glucosamina-6-fosfato, citosina trifosfato (CTP), alanina, glicina e triptofano [6], as enzimas da classe GSI são reguladas por adenililação reversível [7–10]. Em *Escherichia coli*, o grupamento adenilil (AMP) é adicionado ao resíduo conservado Y398 de cada monômero em resposta a altos níveis de amônio [11]. GS é adenililada em resposta à altos níveis de nitrogênio, causando a redução na sua atividade catalítica [9,12,13]. Várias propriedades das enzimas GS não modificada e adenililada são diferentes. Uma forma comum de se quantificar a adenililação é verificando o efeito do magnésio sobre a atividade γ -glutamil transferase: a enzima adenililada é inibida por íons Mg^{2+} [14].

As atividades de GS adenilil transferase (ATase) e remoção de adenilil (AR) são catalisadas pela mesma enzima bifuncional, chamada GlnE (EC: 2.7.7.42 2.7.7.89). A enzima GlnE possui 3 domínios funcionalmente distintos. O domínio N-terminal remove o grupamento adenilil da GS adenililada através de uma reação de fosforólise (AR); o domínio C-terminal usa ATP como doador de adenilil para adenililação de GS (ATase); entre esses dois domínios enzimáticos, o domínio R tem uma suposta função reguladora [15,16].

Nas cascatas regulatórias de GS descritas até agora, a disponibilidade ambiental de nitrogênio é transduzida para GlnE pelas proteínas reguladoras PII. Essas proteínas detectam sinais metabólicos para modular a atividade de uma infinidade de enzimas diferentes por interação direta proteína-proteína [17]. A interação das proteínas PII com suas proteínas alvo depende da ligação de reguladores alostéricos e modificação pós-traducional [17–19]. A bactéria *H. seropedicae*, foco do presente estudo, tem duas proteínas do tipo PII, GlnB e GlnK,

as quais são reversivelmente uridililadas pela enzima GlnD em resposta à razão glutamina:2-OG [20–23]. Em baixos níveis de amônio, GlnD uridilila as proteínas PII em um resíduo conservado de tirosina, e remove o uridilil em condições de alto amônio. As formas não modificadas e uridililadas das proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* podem se ligar a três moléculas de ATP ou ADP; uma vez no estado ligado ao ATP, essas proteínas podem se ligar a três moléculas de 2-OG [24,25].

A regulação das atividades ATase e AR de GlnE foi detalhadamente descrita em *E. coli* e *Rhodospirillum rubrum*. Em *E. coli*, GlnB não modificada e glutamina estimulam a atividade ATase de GlnE, no entanto, alguma atividade ATase é detectada na ausência de qualquer proteína PII [15,26,27]. Ensaios *in vitro* e *in vivo* também indicaram que a adenililação da GS de *E. coli* pode ser estimulada pela proteína GlnK [28]. Em *R. rubrum*, a atividade ATase de GlnE não é regulada pela glutamina e é estritamente dependente de um dos três parálogos de PII desse organismo na forma não modificada, embora as proteínas PII uridililadas inibam essa atividade [29]. Estes dados sugerem que as formas não modificadas e uridililadas das proteínas PII podem competir pela ligação de GlnE.

A atividade ATase de GlnE também é geralmente regulada por níveis de 2-OG. A atividade da ATase da GlnE de *R. rubrum* é inibida pelo 2-OG, porém altos níveis de glutamina podem compensar o efeito inibitório exercido pelo 2-OG [29,30]. Em *E. coli*, é relatada uma regulação paradoxal da atividade ATase da GlnE pelos níveis de 2-OG: em baixas concentrações de 2-OG a atividade de adenililação da GlnE é estimulada, e em altas concentrações inibe a mesma atividade [27]. Nos modelos de *E. coli* e *R. rubrum*, as proteínas PII funcionam como sensores de 2-OG para transduzir os níveis desse metabólito para GlnE [27,29].

A atividade AR da GlnE de *E. coli* é substancialmente ativada por GlnB uridililada, ATP e 2-OG, e inibida por GlnB não modificada [15,27]. Em *R. rubrum*, nem 2-OG, glutamina ou as formas de PII uridililadas ou não modificadas têm efeito sobre a atividade da AR de GlnE, e nenhum outro regulador dessa atividade catalítica foi encontrado, indicando que a AR poderia ser a atividade basal de GlnE de *R. rubrum* [29].

H. seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio, que coloniza os tecidos internos de gramíneas economicamente relevantes, como milho, arroz e sorgo [31]. *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, vibrióide, com grande motilidade quando em concentrações de oxigênio próximas das encontradas no ambiente natural. Ela pertence à classe das Proteobactérias e é capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano aparente ao hospedeiro [32]. *H. seropedicae* é uma bactéria promotora do crescimento de plantas [33], e o nitrogênio fixado por *H. seropedicae* é incorporado na biomassa da planta hospedeira [34]. Devido ao seu alto potencial como inoculante biofertilizante, a descrição do metabolismo do nitrogênio de *H. seropedicae* desperta interesse.

Em *H. seropedicae*, o mecanismo da adenililação da GS ainda não está claro. A estirpe $\Delta glnB$ de *H. seropedicae* possui um padrão de atividade GS semelhante à estirpe selvagem, indicando que GlnB não é estritamente necessária para a regulação da atividade GS [20]. Ensaio *in vivo* mostram que a ausência dos genes *ntrB* e *ntrC*, que codificam as proteínas que controlam a transcrição dos genes de resposta ao estresse por deficiência de amônio, causam um fenótipo de perda da regulação adenililação/desadenililação de GS [35]. No entanto, a regulação da modificação pós-traducional da GS de *H. seropedicae* pelo sistema Ntr permanece desconhecida. Aqui, caracterizamos as atividades ATase e AR de GlnE purificada de *H. seropedicae* *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plasmídeos, cepas bacterianas e condições de cultivo

Os plasmídeos e estirpes bacterianas utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 1. As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em LB e LB-agar em condições padrão [36]. O antibiótico canamicina foi usado na concentração de 100 µg/mL. A indução da superexpressão proteica foi alcançada pela adição de isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,5 mM.

Tabela 1. Plasmídeos e estipes bacterianas.

Estirpe ou plasmídeo	Aplicação
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Armazenar plasmídeo recombinante
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Superexpressão de proteína recombinante
SmRI <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Extrair material genético.
pET28a	Vetor de expressão com cauda de Histidina, resistente à Canamicina.
pETNdeM-11	Vetor de expressão com cauda de Histidina, resistente à Canamicina.

2.2 Clonagem e construção de genes mutantes

As manipulações de DNA foram realizadas de acordo com metodologias padrão de biologia molecular. As sequências de *primers* utilizadas para a amplificação do DNA estão listadas na tabela 2. Os genes amplificados foram clonados no MCS dos vetores de expressão pETNdeM-11 [37] ou pET28a (Novagen). Os genes *glnA* (codifica proteína GS) e *glnE* (codifica proteína GlnE) foram amplificados usando o

DNA genômico da estirpe SmRI de *H. seropedicae*. O gene *glnA* de *H. seropedicae*, que codifica a proteína GS, foi amplificado usando os *primers* *glnA_fwd* e *glnA_rev* e clonado entre os sítios *NdeI* e *XhoI* do vetor pETNdeM-11, gerando o plasmídeo GS-pETNdeM-11. O gene *glnE* foi amplificado usando os iniciadores *glnE_fwd* e *glnE_rev* e clonado entre os sítios *NdeI* e *BamHI* do vetor pETNdeM-11, gerando o plasmídeo GlnE-pETNdeM-11. Para a clonagem do gene *glnA* que codifica a variante de GS com a substituição Y400F, uma estratégia de PCR de *primers* mutagênicos sobrepostos, conforme descrito anteriormente [38]. O produto foi clonado entre os sítios *NdeI* e *XhoI* do vetor pETNdeM-11, gerando o plasmídeo GSY400F-pETNdeM-11.

Tabela 2. Lista dos oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para amplificar os genes *GlnE*, *glnA* e *glnAY400F* de *H. seropedicae*. Os sítios de início e término de tradução estão em negrito.

Iniciador	Sequência (5'→3')
<i>glnE forward</i>	CATCGAC <u>CATATG</u> GCCCGCCGGTTTTCTTC
<i>glnE reverse</i>	GTCAGGATCCTCAGCCAAAGACTTGCTGCCA
<i>glnA forward</i>	CATCGAC <u>CATATG</u> GCAAGGACGGCCGCAGA
<i>glnA reverse</i>	CGCACTCGAGTTACAGCGAGTAGTACATGTCGA
<i>glnA Y400F reverse</i>	CAGGTGGAACAGGTCCTTGGTCGCAG
<i>glnA Y400F forward</i>	CTGCGACCAAGGACCTGTTCCACCTG

2.3 Purificação de proteínas

A cepa BL21 (λ DE3) transformada com um dos plasmídeos de expressão foi cultivada a 37°C sob 120 rpm agitando até DO₆₀₀ 0,6, quando a superexpressão proteica foi induzida pela adição de IPTG a uma concentração final de 0,5 mM, seguida de 3 horas de incubação a 37°C. As células foram coletadas por

centrifugação, ressuspensas em tampão TPA (Tris-Cl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, imidazol 20 mM) e lisadas por sonicação. A suspensão resultante foi centrifugada a 10.800 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante com as proteínas solúveis foi coletado e utilizado para purificação cromatográfica.

Para a purificação das variantes GS e GlnE, as proteínas solúveis foram carregadas em uma coluna de afinidade Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ de 5 mL (GE Lifesciences), que foi lavada com 5 volumes de tampão TPA. As proteínas ligadas foram eluídas em um gradiente crescente de concentração de imidazol (20 - 1000 mM) em tampão TPA. As proteínas purificadas foram dialisadas contra o tampão TPB (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, glicerol a 50%) e armazenadas a -20 ° C.

As proteínas PII, GlnB e GlnK, foram purificadas em uma única etapa cromatográfica usando uma coluna Hi-Trap-Heparin de 5 mL (GE Lifesciences) como descrito anteriormente [39]. As formas uridililadas das proteínas PII foram obtidas como descrito anteriormente [25].

2.4 Determinação da atividade de GS

A atividade específica de GS foi obtida utilizando o método proposto por Bender, 1977 [40], com algumas modificações.

As reações biossintética GS e γ -glutamil foram realizadas a 37°C, durante 60 minutos, nas concentrações indicadas nas tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3 - Lista de reagentes utilizados no teste de atividade GS na reação biossintética com suas respectivas concentrações finais.

Reagente	Concentração Final (mM)
Imidazol pH 7,2	57
Hidroxilamina	28
MgCl ₂	34,3
Glutamato	97,14

Tabela 4 - Lista de reagentes utilizados no teste de atividade GS na reação γ -glutamil transferase com suas respectivas concentrações finais.

Reagente	Concentração Final (mM)
Imidazol pH 6,5	77,14
Hidroxilamina	11,4
MnCl ₂	0,17
Arsênioato de potássio	14,3
ADP	0,23
MgCl ₂	85,7

GS foi adicionada de acordo com as concentrações indicadas nos experimentos. As reações foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C. Após esse período, as reações foram disparadas pela adição de ATP 14 mM (reações biossintéticas) ou glutamina 14 mM em (reações γ -GT) e incubadas em banho-maria a 37 °C por mais 60 minutos.

As reações foram interrompidas pela adição de um STOP MIX ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04 M, TCA 0,12 M e HCl 0,61 M). O produto formado foi quantificado por absorbância a 490 nm, com o auxílio do equipamento Flex Station 3 (Molecular Devices). A quantidade do produto γ -glutamil hidroxamato formado foi quantificada através de uma curva padrão realizada a partir de concentrações conhecidas de γ -glutamil hidroxamato.

2.5 Adenililação e desadenililação de GS in vitro

As atividades da enzima GlnE, ATase e AR, foram determinadas de maneira indireta, pela reação γ -GT, conforme descrita por de [40], com algumas modificações. As proteínas PII e moléculas efetoras foram adicionadas conforme indicado em cada experimento. Tanto o mix de adenililação, quanto o de desadenililação (Tabela 5) foram incubados à 37°C por 20 min. Em seguida, foi realizada a reação γ -GT conforme indicado no item anterior.

Tabela 5. Composição dos Mix de adenililação e desadenililação.

Componente	Concentração Final	
	Mix de Adenililação	Mix de Desadenililação
TRIS pH 7,5	5 mM	5 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM	25 mM
BSA	2 mg.mL ⁻¹	2 mg.mL
ADP	1 mM	-
Glutamina	1 mM	-
ATP	0,2 mM	-
GS	200 nM	-
GS-AMP	-	200 nM
GlnB	23,1 nM	-
GlnE	104 nM	104

2.6 Atividade de GS de *Herbaspirillum seropedicae* in vivo.

A bactéria *H. seropedicae* foi cultivada em meio NFb malato suplementado com 5 mM de glutamato por 24 horas sob agitação. Imediatamente antes do choque de amônio, foi retirada uma alíquota de 20 µL (tempo 0), depois disso, foi adicionado 200 µM de NH₄Cl. Em seguida foram retiradas alíquotas de 20 µL, nos tempos 0,5; 1; 2; 5; 30 minutos. As alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido, com o objetivo de interromper o metabolismo. Após isso as alíquotas foram centrifugadas, as células ressuspensas em 400 µL de KCl 1% e lisadas por sonicação em gelo durante 2 minutos.

Os lisados celulares de todas as frações foram utilizados para avaliar a atividade biossintética, conforme descrito no item 2.4.

2.7 Determinação da inibição da GS por aminoácidos e nucleotídeos.

Adicionou-se no mix de reação biossintética, descrito no item 2.4, 10 mM dos inibidores, Alanina, Glicina, Triptofano, Lisina, Isoleucina, Tirosina, Metionina, Arginina, Valina, Histidina, Leucina, Fenilalanina, Serina, Treonina, Glutamina, AMP e ADP.

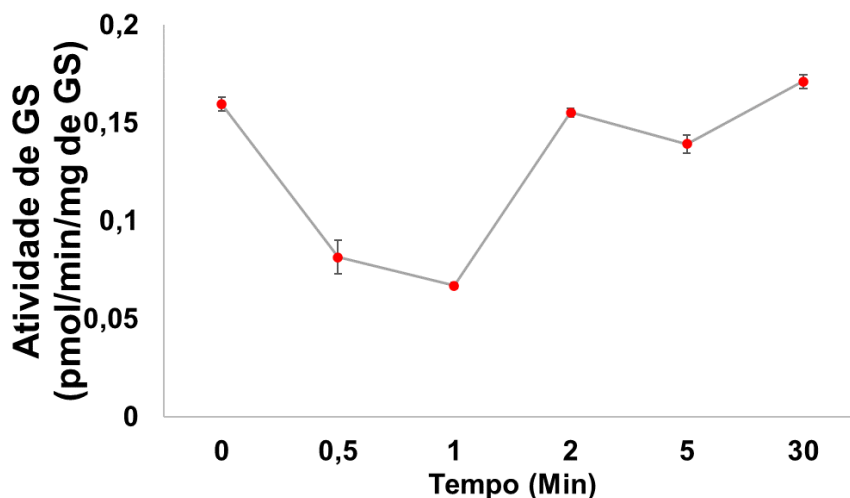
3. RESULTADOS

3.1 Teste de atividade de GS de *Herbaspirillum seropedicae* in vivo

Em *E. coli* o estado de adenililação de GS muda conforme os níveis de amônio presentes no meio variam, de forma que essa modificação pós-tradicional controla a atividade da enzima de acordo com a necessidade metabólica da célula naquele momento. Neste modelo, em baixas concentrações de nitrogênio a GS está na sua forma mais ativa, desadenililada. Já em altas concentrações de nitrogênio, a GS fica adenililada, diminuindo sua atividade. Afim de verificar se o mesmo mecanismo regulatório ocorre em *H. seropedicae*, esta foi cultivada em baixas concentrações de nitrogênio, e após 24 horas foi adicionado 200 μM de NH_4^+ na cultura (choque de amônio). A atividade biossintética de GS foi avaliada imediatamente antes do choque de amônio (tempo 0) e nos tempos 0,5, 1, 5 e 30 minutos após o choque (Figura 1A). Os resultados mostraram que a atividade da enzima sofreu um *switch-off* induzido por amônio, e a atividade foi completamente restaurada em cerca de dois minutos, supostamente após o consumo do amônio adicionado.

A demonstração que a GS de *H. seropedicae* sofre *switch-off* em resposta ao choque de amônio indica que ela pode estar sendo submetida a modificação pós-tradicional, assim como a GS de *E. coli*. Em *E. coli* a adenililação ocorre em um resíduo conservado de tirosina na posição 398. Para verificar se esse resíduo de aminoácido é conservado na GS de *H. seropedicae*, foi realizado um alinhamento entre as sequências dessas duas enzimas (Figura 1B). O alinhamento da sequência de aminoácidos indica que o sítio de adenililação da GS de *E. coli*, o resíduo de tirosina 398, é conservado na GS de *H. seropedicae*, o resíduo tirosina 400. O *switch-off* da GS e o alinhamento indicam que possivelmente o mecanismo de regulação da GS por adenililação reversível pós-tradicional é conservado em *H. seropedicae*. Como a regulação da assimilação de nitrogênio pela GS é uma etapa importante do metabolismo bacteriano, nós nos dedicamos a descrever os mecanismos regulatórios envolvidos nesta modificação pós-tradicional. Os resultados mostrados a partir daqui estão relacionados com a descrição da regulação da determinação de adenililação da GS de *H. seropedicae*, bem como no efeito catalítico dessa modificação.

A.



B.



Figura 1. Atividade biossintética de GS em cultura de *H. seropedicae* antes e após choque de amônio. **A.** Foi adicionado ao mix biossintético 20 μ L de cultura de *H. seropedicae* nos tempos imediatamente antes do choque de amônio (tempo 0) e 0,5, 1, 2, 5 e 30 minutos após o choque de amônio. A reação foi disparada com 14 mM de ATP. As reações aconteceram a 37°C durante 120 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **B.** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína GS das bactérias *H. seropedicae* (AKN66533) a partir do aminoácido 390 até o aminoácido 405 e *Escherichia coli* (WP_001271711) a partir do aminoácido 395 até o aminoácido 410.

3.2 Purificação de GS em meio M9 com níveis diferentes de nitrogênio

No presente trabalho, nós utilizamos a estirpe BL21 de *E. coli* para a expressão da GS recombinante de *H. seropedicae*. A enzima foi superexpressa em duas

condições diferentes: no meio mínimo M9 contendo 0,03 mM de glutamina (GS-gln) e 20 mM de amônio (GS-N), simulando, respectivamente, baixa e alta concentração de nitrogênio no meio [41]. Ensaio de caracterização da atividade da enzima GS de *E. coli* em diversas condições demonstraram que a forma adenilada da enzima tem a atividade γ -GT inibida por íons Mg^{+2} [14] (Figura 2A). Já na atividade biossintética de GS de *E. coli*, a forma adenilada necessita do Mg^{+2} ou Mn^{+2} enquanto a forma desadenilada necessita do cofator Mg^{+2} [42]. Essas metodologias foram empregadas para a caracterização da adenililação das preparações de GS do presente trabalho (Figura 2B).

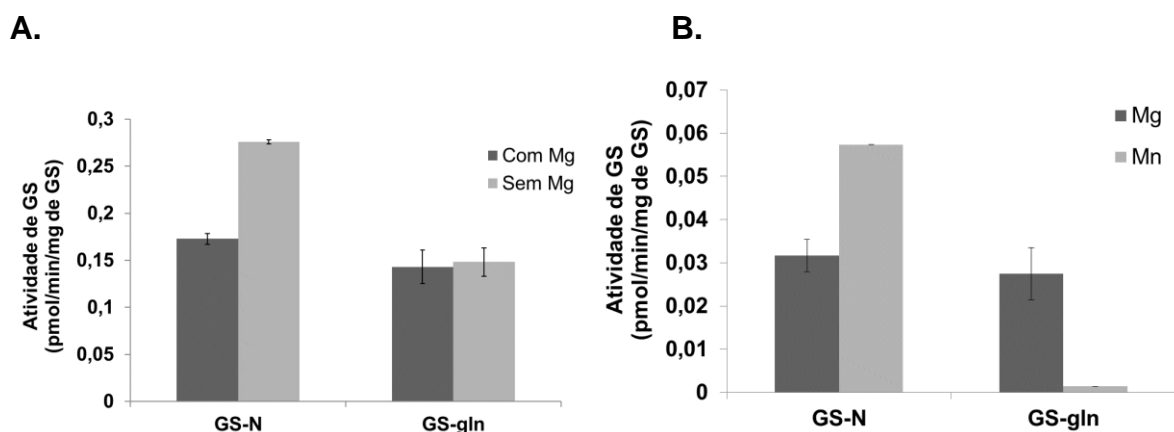


Figura 2- Determinação do estado de adenililação da enzima Glutamina Sintetase de *H. seropedicae* expressa em diferentes condições. A. Reação γ -GT das enzimas GS-gln e GS-N na presença 60 mM do íon Mg^{+2} e ausência do íon no mix γ -GT. Foram adicionados ao mix 200 nM de cada da GS conforme indicado. A reação aconteceu a 37°C durante 60 minutos. Ao final da reação foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **B.** Reação biossintética na presença dos cofatores Mg^{+2} ou Mn^{+2} com 200 nm das enzimas GS-gln ou GS-N. A reação aconteceu a 37°C durante 60 minutos. Ao final da reação foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada na absorvância de 490 nm.

A reação γ -GT catalisada pelas preparações de enzima expressas nas duas condições testadas tiveram diferentes perfis de inibição por íons Mg^{2+} : enquanto a GS expressa em condições de baixo nitrogênio (GS-gln) teve a mesma atividade na presença e ausência de Mg^{2+} , a enzima expressa na presença de 20 mM de NH_4^+

(GS-N) teve maior atividade na ausência de Mg^{2+} . Esses resultados indicam um maior grau de adenililação da enzima GS-N, sugerindo que a GlnE de *E. coli* foi capaz de modificar a GS superexpressa de *H. seropedicae*, ao menos parcialmente, como consequência das condições de nitrogênio do meio de cultura. Da mesma forma, nenhuma atividade biossintética da GS-gln foi detectada na presença de íons Mn^{2+} (2B), ao contrário da enzima GS-N. De fato em *E. coli*, a atividade da GS adenililada é estritamente dependente de íons Mn^{2+} [43], indicando, novamente, adenililação da enzima GS-N. Com essas confirmações dos estados de adenililação das preparações de GS, os ensaios de adenililação apresentados na sequência foram realizados utilizando a enzima expressa em meio com 0,03 mM de glutamina (GS-gln), e nos ensaios de desadenililação foi usada a enzima expressa em 20 mM de NH_4^+ (GS-N).

3.3 Regulação alostérica de GS

Em *E. coli* a enzima GS é inibida alostericamente por Adenosina monofostato (AMP), glucosamina-6-fostato, citosina trifostato (CTP), alanina, glicina e triptofano [44], e a inibição é mais potente quando GS está adenililada [43]. Afim de prospectar inibidores alostéricos da atividade de GS-gln e GS-N de *H. seropedicae*, foram realizados testes enzimáticos na presença de todos os aminoácidos primários, com exceção do glutamato devido a limitações da técnica, já que o glutamato é substrato da reação. Também foi testada a inibição por ADP e AMP. Os resultados são mostrados na figura 3.

Os testes de atividade indicaram que as moléculas sinalizadoras dos níveis energéticos (ADP e AMP) são capazes de atuar como inibidores alostéricos sobre a GS-N, enquanto os aminoácidos tirosina, treonina e glutamina são inibidores da GS-gln. Ou seja, ambas as formas, adenililada e desadenililada, da enzima GS de *H. seropedicae* são sensíveis a inibição alostérica, sendo que GS-N responde aos níveis energéticos, enquanto GS-gln responde aos aminoácidos tirosina, treonina e glutamina.

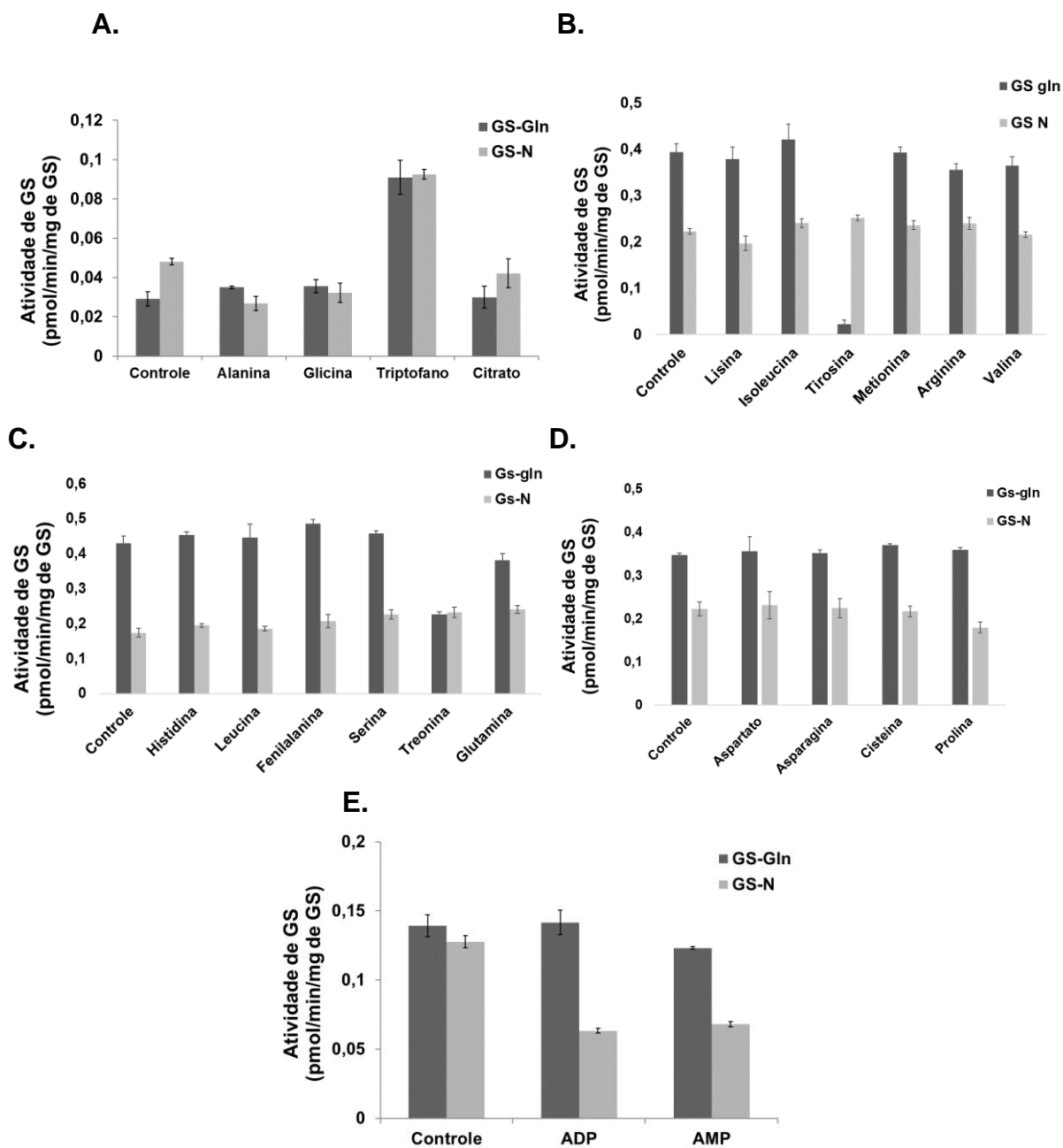


Figura 3. Regulação alostérica de Glutamina sintetase adenilada e desadenilada. Foi adicionado ao mix biossintético 200 nM de GS-gln ou GS-N e 10 mM dos efetores. A reação foi disparada com 14 mM de ATP. As reações aconteceram a 37°C durante 120 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **A.** Os efetores usados foram: Alanina, glicina, triptofano. **B.** Os efetores usados foram: Lisina, isoleucina, tirosina, metionina, arginina e valina. **C.** Os efetores usados foram: Histidina, leucina, fenilalanina, serina, treonina e glutamina. **D.** Os efetores usados foram: Aspartato, arginina, cisteína e prolina. **E.** Os efetores usados foram: ADP e AMP.

3.4 Adenililação e desadenililação de GS por GlnE de *H. seropedicae* *in vitro*.

Para a descrição detalhada do mecanismo de regulação da modificação pós-traducional da enzima GS de *H. seropedicae*, nós buscamos reproduzir *in vitro* o sistema de adenililação, situação que permite um maior controle das condições experimentais. Como a atividade da proteína adenililada é maior na ausência de Mg^{2+} (Figura 2A), nós utilizamos essa propriedade para caracterizar adenililação/desadenililação de GS por GlnE na sequência do trabalho. Logo, sempre que a atividade da enzima GS aumenta na ausência de Mg^{2+} , isso significa adenililação, e o oposto também é verdadeiro.

Para verificar a regulação do estado de modificação de GS, foi purificada uma versão recombinante da enzima GlnE de *H. seropedicae* e testada suas atividades ATase e AR contra os substratos GS-gln e GS-N, respectivamente (Figura 4 A e B). Os resultados indicaram que a enzima GlnE purificada foi capaz de adenililar e desadenililar GS nas condições testadas.

A fim de confirmar a posição da modificação pós-traducional, nós construímos um gene mutante que codifica uma versão da GS de *H. seropedicae* contendo a mutação Y400F de *H. seropedicae*, que possui uma substituição na provável tirosina sítio da modificação (Figura 1B) por uma fenilalanina. Essa proteína mutante foi purificada, e a capacidade de GlnE modificá-la também foi testada (Figura 4C). Nossos resultados indicaram que essa variante mutante não foi adenililada (Figura 4C), confirmando a que o sítio de adenililação da GS de *H. seropedicae* é o resíduo conservado de tirosina 400, conforme previsto pela análise do alinhamento.

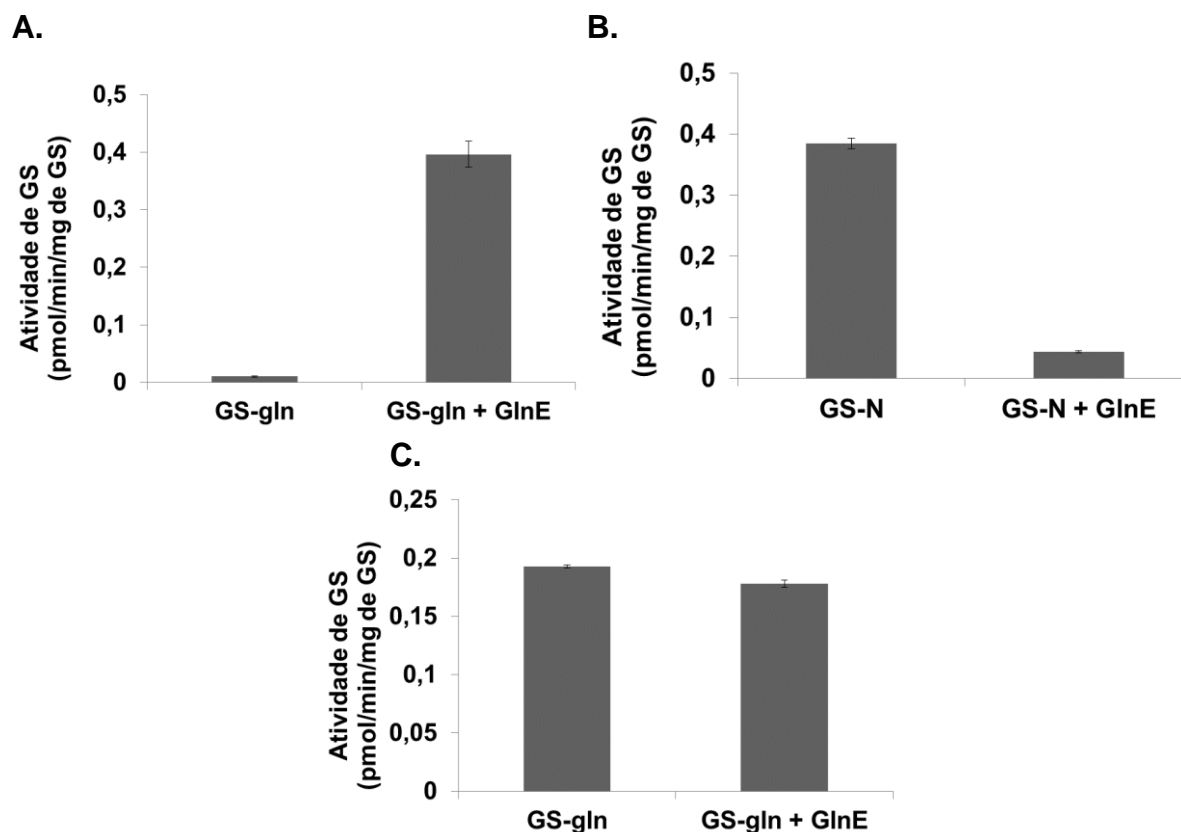


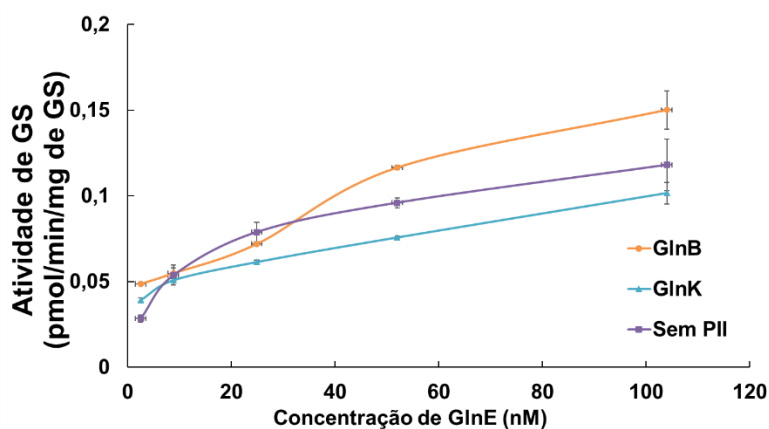
Figura 4- Efeito da enzima GlnE sobre a atividade γ -GT da enzima GS de *H. seropedicae*. Em todos os experimentos foram utilizados 104 nM de GlnE, 23 μ M de GlnB e 200 nM de GS. As reações de adenililação/desadenililação aconteceram a 37°C durante 20 min, após o qual foi adicionado o mix γ -GT na ausência de Mg^{+} , e disparada com glutamina 14 mM. A reação γ -GT aconteceu a 37°C durante 60 minutos. Ao final da reação foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. **A.** Atividade ATase da enzima GlnE sobre a enzima GS-gln. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **B.** Atividade AR da enzima GlnE de *H. seropedicae* sobre a GS-N. **C.** Atividade ATase da enzima GlnE sobre a enzima GS-Y400F.

3.5 Regulação da atividade ATase pelas proteínas PII

Em *E. coli* e *R. rubrum* as proteínas PII participam da regulação da enzima GlnE, e essa regulação depende do estado de uridililação destas [15,27,29]. Com o objetivo de verificar a regulação de GlnE de *H. seropedicae* pelas proteínas PII deste organismo, nós testamos as atividades ATase de GlnE na presença de GlnB,

GlnB-UMP, GlnK, GlnK-UMP purificadas e também na ausência de PII. Como mostrado na figura 5, a atividade ATase é máxima na presença das proteínas GlnB e GlnK não uridililadas. Contudo ela ainda ocorre na presença nas proteínas uridililadas e até mesmo na ausência de qualquer tipo de PII, diferente de proteínas GlnE de *E. coli* e *R. rubrum*.

A.



B.

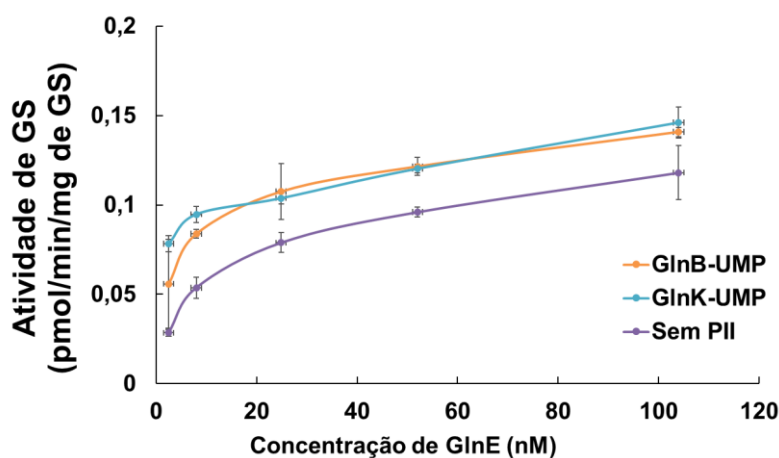


Figura 5- Regulação da atividade ATase de GlnE pelas proteínas PII. As reações de adenililação aconteceram com 104 nM GlnE, 200 nM de GS-gln, 23 μ M de PII conforme indicado a 37°C durante 20 min, seguida da adição do mix γ -GT na ausência de Mg^{+2} e disparada com glutamina 14 mM. As reações γ -GT aconteceram a 37°C durante 60 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **A.** Efeito das proteínas PII não modificadas sobre a ATase. **B.** Efeito das proteínas PII uridililadas sobre a ATase.

3.6 Regulação da atividade ATase de GlnE por efetores alostéricos.

A fim de testar o efeito de efetores alostéricos sobre a atividade ATase de GlnE, foram realizados ensaios de adenililação de GS *in vitro* na presença de 2-OG. Como mostrado na figura 6, na ausência de PII o 2-OG não teve nenhum efeito sobre a atividade ATase de GlnE. Quando na presença das proteínas PII, o 2-OG teve um efeito inibitório da atividade ATase, sendo que parece ser mais pronunciado na presença de GlnB e GlnB uridililada em relação a GlnK. No entanto, o complexo contendo a proteína GlnK uridililada parece não ter sido sensível aos níveis de 2-OG.

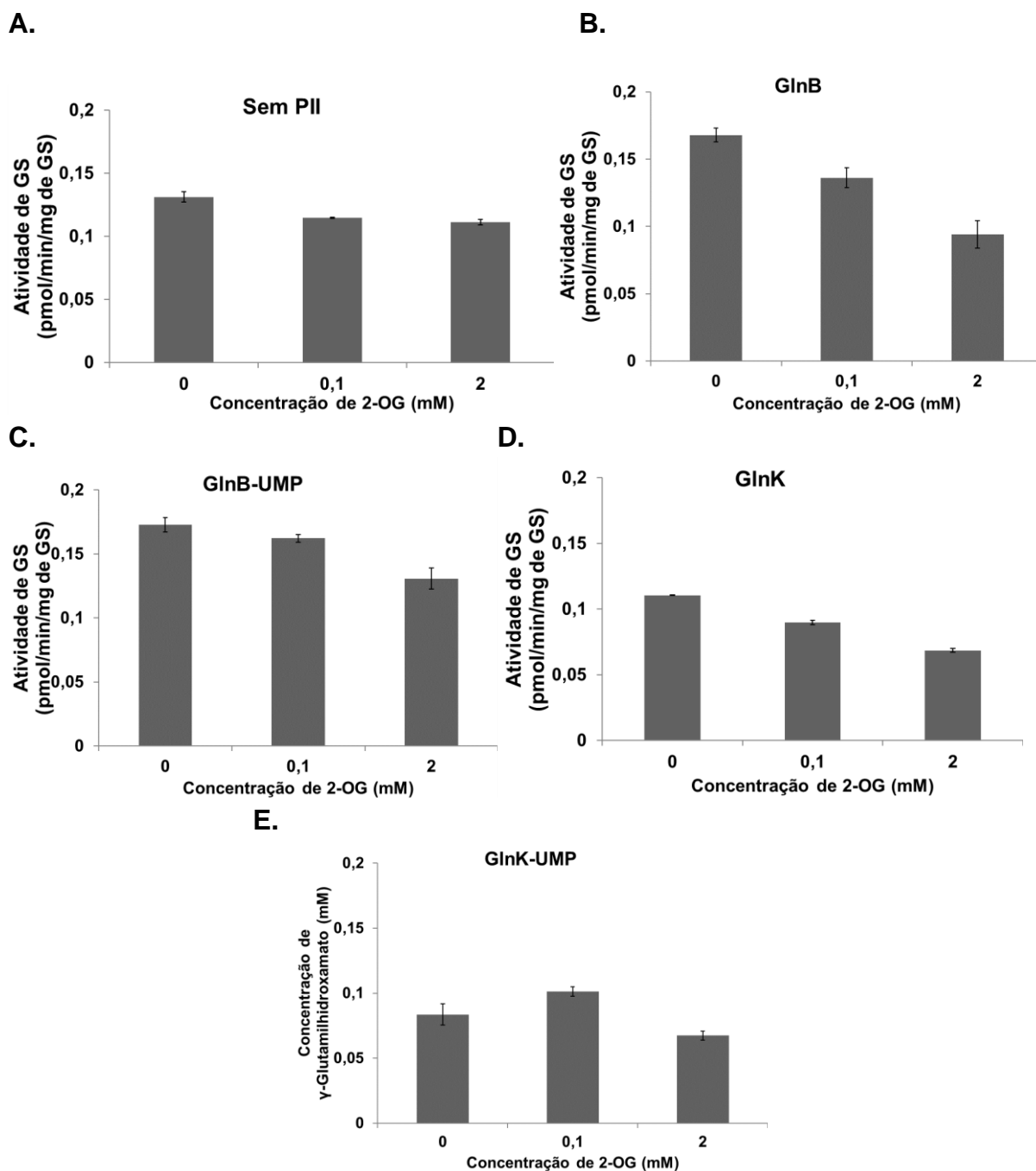


Figura 6 - Efeito do 2-OG na atividade ATase de GlnE. Atividade ATase de 104 nM de GlnE sobre 200 nM de GS-gln na presença de 23 μ M de proteínas PII. As reações de adenililação aconteceram a 37°C durante 20 min, após o qual foi adicionado o mix γ -GT na ausência de Mg^{+2} 60 mM e disparada com glutamina 14 mM. As reações γ -GT aconteceram a 37°C durante 60 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **A.** Na ausência de proteína PII. **B.** Na presença de proteína GlnB. **C.** Na presença de proteína GlnB-UMP. **D.** Na presença da proteína GlnK. **E.** Na presença da proteína GlnK-UMP.

Com o objetivo de explorar mais o mecanismo de regulação da proteína GlnE, nós ainda testamos o efeito de ATP e glutamato sobre a atividade ATase de GlnE. Os resultados da figura 7 sugerem que o glutamato tem um pequeno efeito inibitório da atividade ATase de GlnE de *H. seropedicae*. O ATP, por sua vez, teve um forte efeito inibitório sobre a atividade ATase, já que nenhuma adenililação foi observada quando ATP foi adicionado.

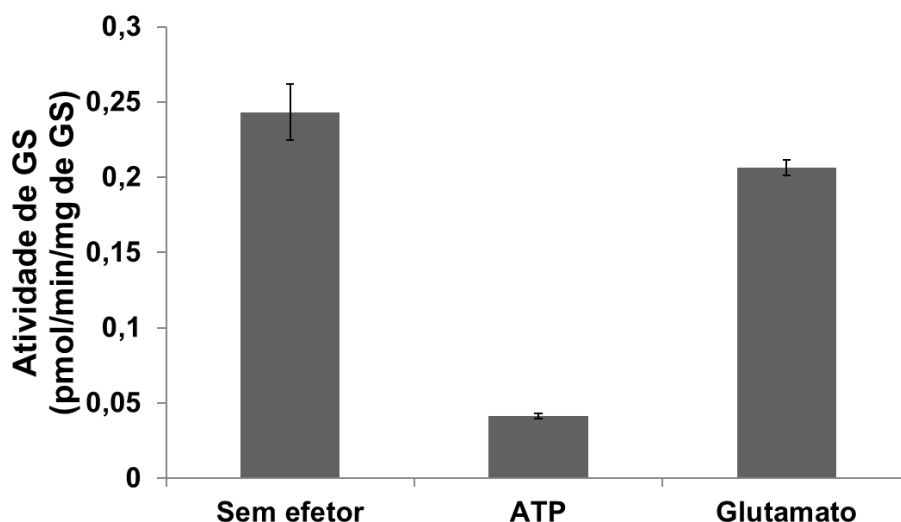


Figura 7 – Efeito dos efetores ATP e glutamato sobre a atividade ATase de GlnE. Atividade ATase de GlnE (104 nM) sobre GS-gln (200 nM) na presença 1 mM de ATP ou 1 mM de glutamato e na ausência dos efetores, conforme indicado. As reações de adenililação aconteceram a 37°C durante 20 min, seguidas da adição do mix γ -GT na ausência de Mg^{+2} 60 mM e disparada com glutamina 14 mM. As reações γ -GT aconteceram a 37°C durante 60 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

3.7 Regulação da atividade AR pelas proteínas PII

Há dois modelos de regulação da atividade AR de GlnE melhor caracterizados até o momento, que são os de *E. coli* e *R. rubrum*. Em *E. coli*, a atividade AR da proteína GlnE é estimulada pelas proteínas PII uridililadas [15,27]. Já em *R. rubrum* as formas de PII uridililadas ou não modificadas não têm efeito sobre a atividade da AR de GlnE [29]. Com o objetivo de verificar qual desses fenômenos regulatórios é encontrado em *H. seropedicae*, nós avaliamos a atividade AR na presença e ausência das proteínas PII, tanto não modificadas como uridililadas. Nossos resultados indicaram que PII-UMP não estimula a atividade AR, e esta não depende da presença de PII alguma, conforme mostrado na figura 8. Portanto, o modelo de regulação da atividade AR da proteína GlnE de *H. seropedicae* parece ser diferente do homólogo de *E. coli* e é mais próximo com o modelo de regulação do *R. rubrum*.

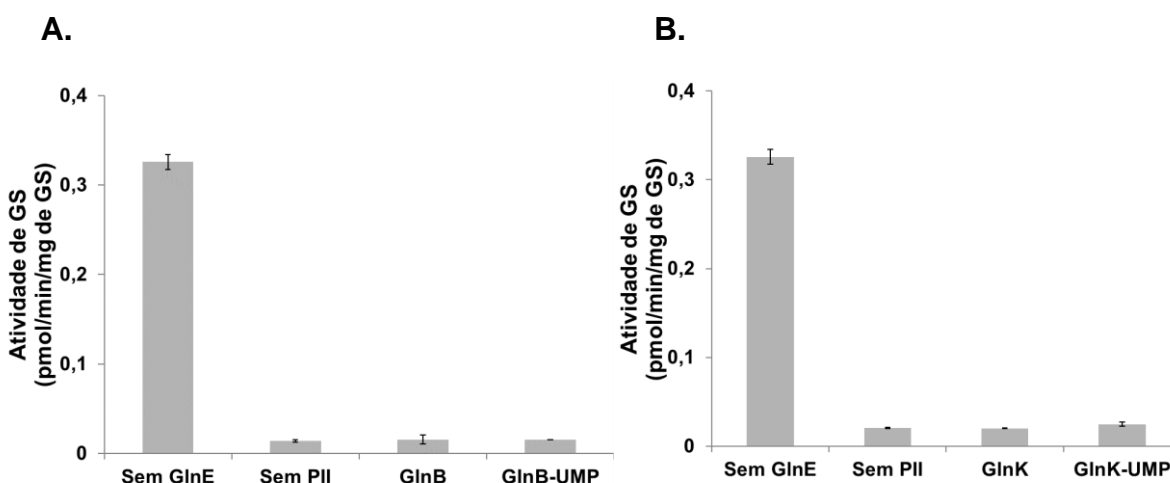


Figura 8 – Regulação da atividade AR de GlnE pelas proteínas PII. Atividade AR da enzima GlnE de *H. seropedicae* sobre a GS-N. Neste experimento, foram adicionados ao mix de desadenililação 104 nM de GlnE, 23 μ M de PII, de acordo com o indicado na figura, 200 nM de GS-N e 1 mM de ATP. A reação de desadenililação aconteceu a 37°C durante 20 min, após o qual foi adicionado o mix γ -GT na ausência de Mg^{+2} 60 mM e disparada com glutamina 14 mM. A reação γ -GT aconteceu a 37°C durante 60 minutos. Ao final da reação foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhidroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **A.** Reação AR na presença ou ausência de GlnB. **B.** Reação AR na presença ou ausência de GlnK.

3.8 Regulação alostérica da atividade AR de GlnE

O fato das proteínas PII não participarem da regulação da atividade AR de GlnE de *H. seropedicae* sugere que a regulação desta atividade deve ser mediada por efetores alostéricos. Por isso, nós investigamos o efeito de ATP, ADP, glutamato e 2-OG. Os resultados da figura 9A mostram que o ATP estimula a atividade AR da proteína GlnE de *H. seropedicae*, e é estritamente necessário para a desadenililação. Os resultados indicam, ainda, que o ADP não é capaz de substituir o ATP nesta função (Figura 9A). Além disso, quando o ATP é adicionado na presença de ADP, o poder de estímulo do ATP é diminuído, sugerindo que o ADP pode atuar como um inibidor da desadenililação (Figura 9B).

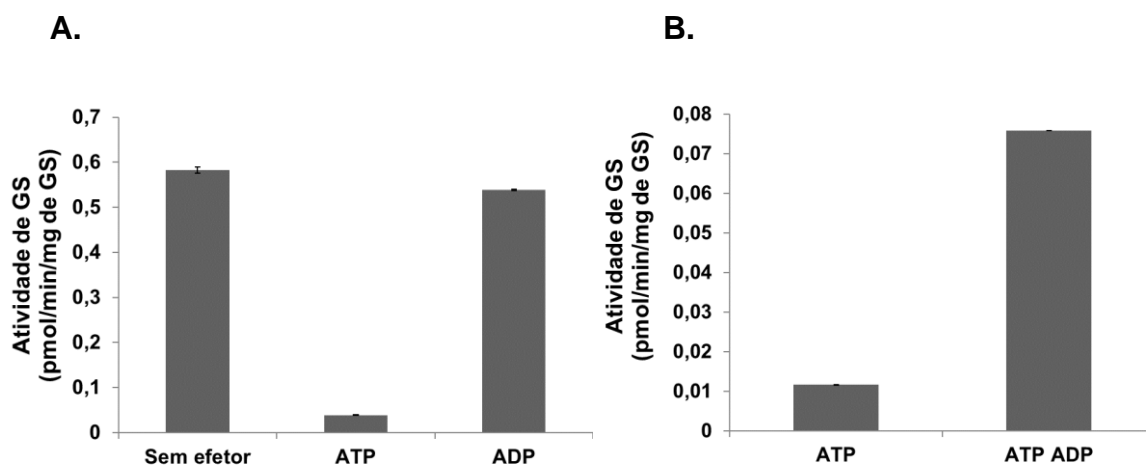


Figura 9 – Efeito dos efetores ATP e ADP sobre a atividade AR de GlnE isolados e usados em conjunto. **A.** Atividade AR de GlnE (104 nM) sobre GS-N (200 nM) na presença 1 mM de ATP ou 1 mM de ADP e na ausência dos efetores. As reações de desadenililação aconteceram a 37°C durante 20 min, seguida da adição do mix γ -GT na presença e ausência de Mg^{+2} 60 mM e disparada com glutamina 14 mM. As reações γ -GT aconteceram a 37°C durante 60 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de gama-glutamilhidroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. **B.** Atividade AR de GlnE (104 nM) sobre GS-N (200 nM) na presença 1 mM de ATP e 1 mM de ADP e na ausência dos efetores. As reações de desadenililação e γ -GT foram realizadas seguindo a mesma metodologia descrita no item A.

Assim como o ATP, o glutamato tem efeito inibitório na atividade ATase de GlnE (Figura 7). Por isso, nós verificamos se o glutamato também seria capaz de estimular a atividade AR de GlnE. Os resultados mostrados na figura 10 indicam que o glutamato não tem qualquer efeito sobre a reação AR. Portanto, o glutamato apenas inibe a atividade ATase, não estimulando a AR de GlnE.

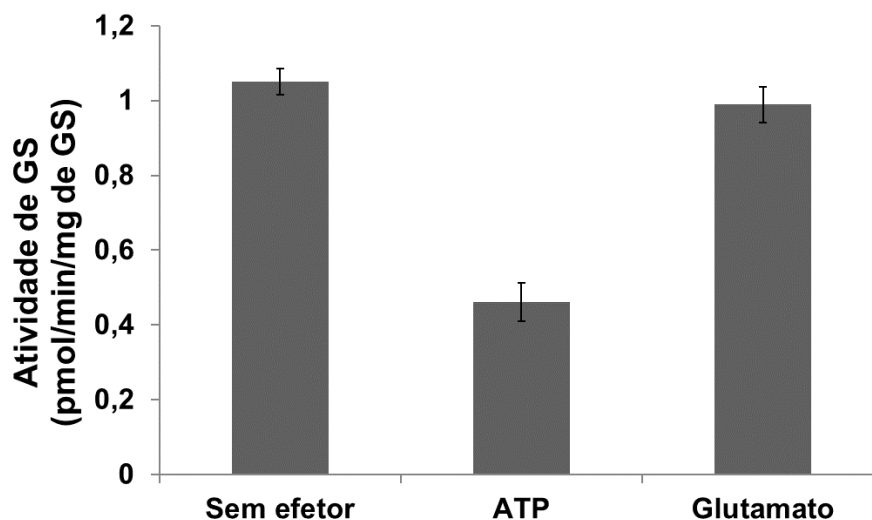


Figura 10 – Efeito do Glutamato sobre a atividade AR de GlnE. Atividade AR de GlnE (104 nM) sobre GS-N (200 nM) na presença 1 mM de ATP ou 1 mM de glutamato e na ausência dos efetores, conforme indicado. As reações de desadenilação aconteceram a 37°C durante 20 min, seguida da adição do mix γ -GT na ausência de Mg^{+2} 60 mM e disparada com glutamina 14 mM. As reações γ -GT aconteceram a 37°C durante 60 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de γ -glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Nós verificamos, ainda, o efeito de 2-OG sobre a atividade AR da proteína GlnE de *H. seropedicae*. Os resultados mostraram que 2-OG teve pouco efeito sobre a atividade AR. (Figura 11).

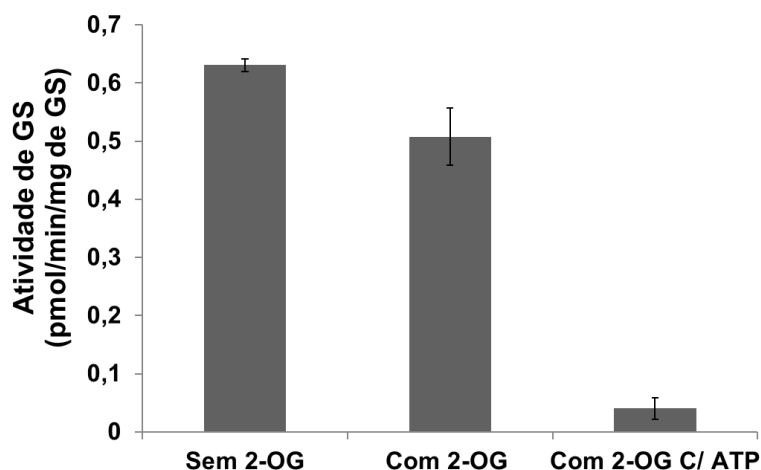


Figura 11 – Efeito do efetor 2-OG sobre a atividade AR de GlnE. Atividade AR de GlnE (104 nM) sobre GS-N (200 nM) na presença 1 mM de ATP ou 5 mM de 2-OG e na ausência dos efetores. As reações de desadenilação aconteceram a 37°C durante 20 min, seguida da adição do mix γ -GT na ausência de Mg^{+2} 60 mM e disparada com glutamina 14 mM. As reações γ -GT aconteceram a 37°C durante 60 minutos. Ao final das reações foi adicionado 100 μ L do Stop mix e a formação de gama-glutamilhdroxamato foi quantificada em espectrofotômetro à 490 nm. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

4. DISCUSSÃO

A enzima GS catalisa a primeira reação da via de assimilação de amônio em bactérias, com gasto de ATP. O glutamato e a glutamina formados pelas reações catalisadas pela via GS /GOGAT são os principais doadores de grupos amino para diversas reações biossintéticas, e por isso as suas concentrações intracelulares necessitam ser precisamente reguladas. De fato, em *E. coli* os níveis intracelulares de glutamina e glutamato variam pouco, mesmo com baixa disponibilidade de amônio no meio de cultura [6]. Portanto, o gasto energético associado com a assimilação de amônio, e a necessidade de manutenção de níveis de glutamina e glutamato exigem um ajuste fino do fluxo metabólico através da via GS/GOGAT. Esse ajuste fino da atividade de GS de *H. seropedicae* ficou evidente no ensaio de choque de amônio *in vivo*: a adição de amônio ao meio de cultura provoca uma drástica e rápida redução da atividade enzimática (Figura 1A). Já nossos ensaios *in vitro* demonstraram, que a adenililação da enzima GS é responsável pela queda na atividade catalítica da enzima (Figura 3), e que o sistema de regulação do estado de modificação pós-traducional da GS de *H. seropedicae* integra uma série de informações moleculares sobre o estado metabólico da célula.

Nossos resultados mostraram que a GS expressa no sistema heterólogo com alto amônio (GS-N) foi purificada parcialmente adenililada, e que a enzima GS expressa em baixas concentrações de nitrogênio (GS-gln), se encontra desadenililada (Figura 4). Dessa forma, pode-se concluir que a enzima GS de *H. seropedicae* recombinante é substrato da enzima GlnE nativa de *E. coli*, mesmo em condições de superexpressão. Esses resultados indicam que o sítio de adenililação da proteína GS de *E. coli* deve estar conservado na GS de *H. seropedicae*. Essa informação foi confirmada com a não adenililação *in vitro* da variante mutante GS Y400F (Figura 4C).

A transdução do sinal de nitrogênio para a proteína GlnE de *E. coli* e *R. rubrum* ocorre pela interação com as proteínas da família PII [15,27,29]. Em *R. rubrum* as proteínas PII uridililadas inibem a atividade ATase, e em *E. coli* a GlnB-UMP também pode inibir a atividade ATase em algumas condições. Adicionalmente, a GlnE de *E. coli* tem sua atividade AR aumentada por GlnB-UMP. Nossos resultados apresentados aqui demonstraram que as proteínas PII também participam da

regulação de GlnE de *H. seropedicae*, embora o mecanismo pareça ser diferente dos anteriormente descritos nesses outros organismos. Em *H. seropedicae* tanto as proteínas PII uridililadas ou não uridililadas estimulam a atividade ATase de GlnE (Figura 5). Além disso, a atividade AR não foi estimulada pelas PII uridililadas diferente do encontrado em *E. coli* (Figura 8).

Em *E. coli* e *R. rubrum*, a regulação de GlnE pelas PII é modulada por 2-OG [27–29]. Os nossos resultados indicaram que em *H. seropedicae* o 2-OG não exerce qualquer efeito sobre a atividade AR, mas inibe a atividade ATase apenas na presença de proteínas PII, tanto GlnB quanto GlnK (Figura 6). Possivelmente a interação das proteínas PII com GlnE é rompida quando PII liga 2-OG. Como em *H. seropedicae* o 2-OG é um metabólito cuja concentração intracelular varia de acordo com a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura [25], esses resultados sugerem que a inibição da atividade ATase de GlnE se constitui em um mecanismo de transdução do status de nitrogênio para o sistema GlnE-GS.

Uma outra forma de regulação da atividade de GlnE por moléculas que sinalizam o status de nitrogênio na célula foi encontrada: o glutamato teve um leve efeito inibitório sobre a atividade ATase da GlnE de *H. seropedicae* (Figura 7). É possível que o glutamato esteja mimetizando o efeito do 2-OG por interação com a proteína PII, rompendo o complexo GlnE-PII e, portanto, impedindo que PII estimule a atividade ATase de GlnE. A mesma interpretação foi sugerida para a regulação de GlnE de *E. coli* por glutamato [27].

Além de ser regulada por sinais que indicam níveis de nitrogênio, a GlnE de *H. seropedicae* é claramente sensível a razão ATP/ADP. A atividade ATase de GlnE foi totalmente inibida pelo ATP (Figura 7) e o ATP estimula fortemente a atividade AR (Figura 9A). Nós ainda testamos o efeito de ADP sobre a atividade AR de GlnE de *H. seropedicae*. O ADP não estimulou a atividade AR (Figura 9A), não sendo capaz de substituir o ATP nesta função, e quando adicionado junto com o ATP, diminuiu o efeito estimulatório do ATP sobre a atividade AR (Figura 9B). Essa regulação provavelmente está relacionada com o gasto energético decorrente da assimilação de NH_4^+ através da via GS/GOGAT [45]. Em *E. coli*, devido ao custo energético da assimilação de nitrogênio por essa via, a assimilação de amônio em condições de

baixa energia parece acontecer pela glutamato desidrogenase (GDH), possivelmente para poupar ATP [45]. Nossos resultados indicam que o fluxo metabólico através da via GS/GOGAT em *H. seropedicae* também sofre forte influência do estado energético da célula, e em baixas concentrações de ATP a GS é adenililada, diminuindo sua atividade catalítica, o que possivelmente também culmina com um menor gasto de ATP em uma situação de baixos níveis energéticos.

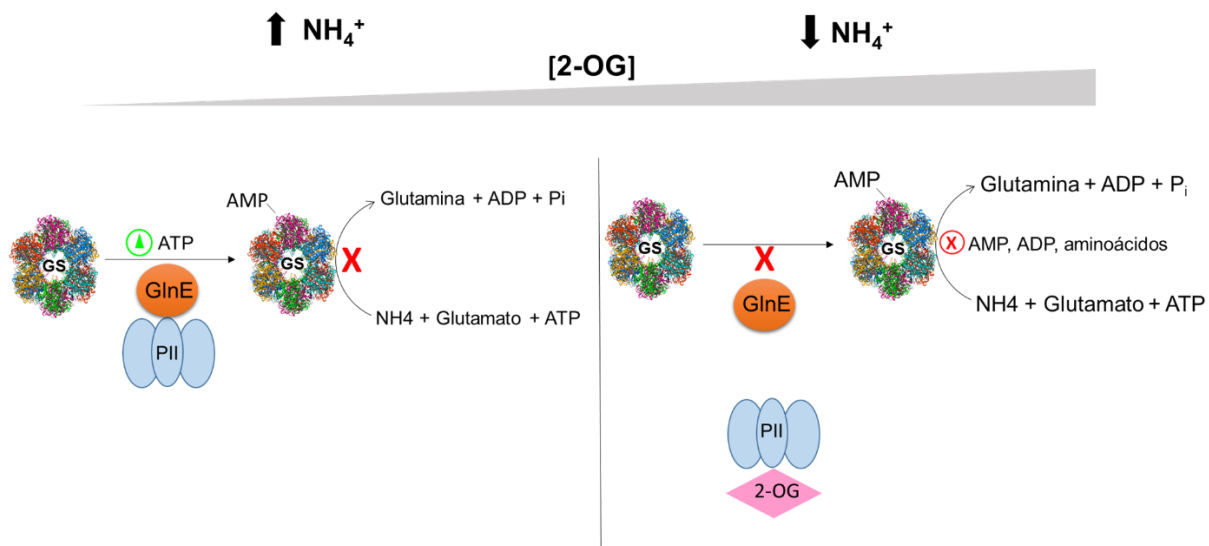
Em *E. coli*, a atividade AR de GlnE é estimulada por 2-OG, ATP e GlnB-UMP [15,27]. Em *R. rubrum*, por sua vez, a atividade AR parece ser constitutiva para a enzima GlnE, e nenhum regulador dessa atividade foi encontrado [29]. Aqui, nós mostramos que a atividade AR da GlnE de *H. seropedicae* não foi regulada pelas proteínas PII (figura 8), nem por 2-OG (figura 11), ou por glutamato (figura 10). Dos reguladores testados nesse trabalho, nós conseguimos observar regulação da atividade AR apenas pela razão ATP/ADP (figura 9). Dessa forma, nós propomos que a razão ATP/ADP é o principal regulador da atividade AR de GlnE de *H. seropedicae*.

Os resultados mostrados até aqui demonstram que o estado de modificação da proteína GS de *H. seropedicae* é determinado pela integração dos sinais de 2-OG e razão ATP/ADP. Um nível adicional de regulação da atividade da GS de *H. seropedicae* por sinalizadores dos níveis de nitrogênio acontece via inibição alostérica da reação biossintética, e o mecanismo dessa inibição nunca foi descrito para outros organismos (Figura 3). Em *E. coli*, a forma adenililada de GS é fortemente inibida pelos aminoácidos alanina, glicina e triptofano [44]. Ao contrário, a atividade biossintética da GS adenililada de *H. seropedicae* não foi inibida por nenhum aminoácido testado. A GS não modificada, por sua vez, foi inibida pelos aminoácidos tirosina, treonina e glutamina. Como a glutamina e o glutamato formados na via GS/GOGAT são doadores de grupos amino para síntese de todos os aminoácidos, esta inibição alostérica é um tipo de *feedback* negativo que atua sobre a enzima. É interessante que em *E. coli* o *feedback* negativo exercido por aminoácidos tenha como alvo a forma menos ativa da enzima, a adenililada, e em *H. seropedicae* seja a forma mais ativa, a não modificada. Portanto, em *H. seropedicae* aparentemente esse mecanismo de inibição se constitui numa forma de modulação da atividade de GS não modificada, que naturalmente tem maior atividade catalítica.

Além de aminoácidos, nós conseguimos detectar que moléculas sinalizadoras do estado energético da célula como efetores alostéricos da GS de *H. seropedicae* (Figura 3E). Neste caso, o alvo da inibição alostérica foi a proteína adenililada: o ADP e o AMP, sinalizadores associados com baixa disponibilidade de energia, inibem a forma adenililada da enzima. Portanto, diferente do que acontece em *E. coli*, a adenililação de GS, além de diminuir a atividade de GS, provoca um aumento da sensibilidade aos sinais energéticos, mas não de aminoácidos. Portanto, podemos concluir que o modelo de regulação alostérica da GS de *H. seropedicae* é também bastante diferente daquele descrito para *E. coli*.

Sumarizando, nós utilizamos uma abordagem de atividade *in vitro* para descrevermos o modelo de regulação da enzima GlnE de *H. seropedicae*, o qual tem algumas características únicas, nunca descritas na literatura que descreve os mecanismos regulatórios dos sistemas ortólogos. O mecanismo de regulação aqui descrito permite a integração de sinais de disponibilidade de nitrogênio e carbono, e também da razão ATP/ADP. Assim, o estado de modificação pós-traducional de GS de *H. seropedicae* é regulado finamente de acordo com as condições ambientais encontradas pela bactéria. Os resultados permitiram construir o seguinte modelo sobre a regulação da assimilação de amônio em *H. seropedicae* (Figura 12): Em baixas concentrações de amônio, os níveis de 2-OG são altos, fazendo com que a GS expressa não seja adenililada por GlnE. Essa forma de GS pode eventualmente ser inibida por *feedback* negativo por aminoácidos, caso a concentração de glutamina aumente. Quando o amônio é adicionado, o 2-OG é consumido na assimilação deste, permitindo que GS seja rapidamente adenililada por GlnE, levando a uma diminuição na sua atividade para que os níveis de glutamina não se elevem demais, poupando assim ATP, o qual é consumido na atividade de GS. Uma diminuição ainda maior da atividade de GS adenililada acontece quando a razão ATP/ADP cai, através da inibição alostérica exercida pelo ADP e pelo AMP. A razão ATP/ADP também exerce efeito sobre o próprio estado de modificação de GS. Em condições de abundância de energia (alta razão ATP/ADP), a GlnE desadenilila GS, aumentando sua atividade.

Figura 12. Modelo de regulação pós-tradicional e alósterica de GS em baixas e altas concentrações de nitrogênio.



REFERÊNCIAS

- [1] J.A. Leigh, J.A. Dodsworth, Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea, *Annu. Rev. Microbiol.* 61 (2007) 349–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093409>.
- [2] D. Eisenberg, H.S. Gill, G.M.U. Pfluegl, S.H. Rotstein, Structure-function relationships of glutamine synthetases, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477 (2000) 122–145. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00270-8).
- [3] M.J. Merrick, R.A. Edwards, Nitrogen control in bacteria, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 604–622.
- [4] C.A. Woolfolk, B. Shapiro, E.R. Stadtman, Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 116 (1966) 177–192. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(66\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(66)90026-9).
- [5] K.J.F. Farnden, J.G. Robertson, Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase., *Methods Stud. Enzym. Invol. Metab. Relat. to Nitrogenase.* (1980) 265–314.
- [6] J. Schumacher, V. Behrends, Z. Pan, D.R. Brown, F. Heydenreich, M.R. Lewis, M.H. Bennett, B. Razzaghi, M. Komorowski, M. Barahona, M.P.H. Stumpf, S. Wigneshweraraj, J.G. Bundy, M. Buck, Nitrogen and carbon status are integrated at the transcriptional level by the nitrogen regulator NtrC in vivo, *MBio.* 4 (2013). <https://doi.org/10.1128/mBio.00881-13>.
- [7] W.B. Anderson, E.R. Stadtman, Glutamine synthetase deadenylation: a phosphorolytic reaction yielding ADP as nucleotide product., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41 (1970) 704–9. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(70\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(70)90070-7).
- [8] H. Schutt, H. Holzer, Biological Function of the Ammonia-Induced Inactivation of Glutamine Synthetase in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 26 (1972) 68–72.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01740.x>.

- [9] S. Kustu, J. Hirschman, D. Burton, J. Jelesko, J.C. Meeks, Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance, *MGG Mol. Gen. Genet.* 197 (1984) 309–317. <https://doi.org/10.1007/BF00330979>.
- [10] S. Nordlund, R.H. Kanemoto, S.A. Murrell, P.W. Ludden, Properties and regulation of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum*., *J. Bacteriol.* 161 (1985) 13–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2857158> (accessed February 4, 2020).
- [11] R.L. Heinrikson, H.S. Kingdon, Primary structure of *Escherichia coli* glutamine synthetase. II. The complete amino acid sequence of a tryptic heneicosapeptide containing covalently bound adenylic acid., *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1099–106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5543675> (accessed January 22, 2020).
- [12] A. Hammarström, A. Soliman, S. Nordlund, Low- and high-activity forms of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum*: sensitivity to feed-back effectors and activation of the low-activity form, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1080 (1991) 259–263. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90011-N](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90011-N).
- [13] W.C. van Heeswijk, H. V Westerhoff, F.C. Boogerd, Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (2013) 628–95. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-13>.
- [14] E.R. Stadtman, P.Z. Smyrniotis, J.N. Davis, M.E. Wittenberger, Enzymic procedures for determining the average state of adenylation of *Escherichia coli* glutamine synthetase, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 275–285. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90217-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90217-3).
- [15] R. Jaggi, W.C. Van Heeswijk, H. V. Westerhoff, D.L. Ollis, S.G. Vasudevan, The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction, *EMBO J.* 16 (1997) 5562–5571. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.18.5562>.

- [16] P. Clancy, Y. Xu, W.C. Van Heeswijk, S.G. Vasudevan, D.L. Ollis, The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain, *FEBS J.* 274 (2007) 2865–2877. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05820.x>.
- [17] L.F. Huergo, G. Chandra, M. Merrick, PII signal transduction proteins: Nitrogen regulation and beyond, *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (2013) 251–283. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00351.x>.
- [18] T. Arcondeguy, R. Jack, M. Merrick, PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001) 80–105. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.1.80-105.2001>.
- [19] M. Radchenko, M. Merrick, The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins, *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011) 189–194. <https://doi.org/10.1042/BST0390189>.
- [20] E.M. Benelli, E.M. Souza, S. Funayama, L.U. Rigo, F.O. Pedrosa, Evidence for two possible glnB-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 4623–4626. <https://doi.org/10.1128/jb.179.14.4623-4626.1997>.
- [21] L. Noindorf, F.G.M. Rego, V.A. Baura, R.A. Monteiro, R. Wassem, L.M. Cruz, L.U. Rigo, E.M. Souza, M.B.R. Steffens, F.O. Pedrosa, L.S. Chubatsu, Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*, *Arch. Microbiol.* 185 (2006) 55–62. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0066-4>.
- [22] A.C. Bonatto, G.H. Couto, E.M. Souza, L.M. Araújo, F.O. Pedrosa, L. Noindorf, E.M. Benelli, Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*, *Protein Expr. Purif.* 55 (2007) 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.04.012>.
- [23] M.T. Emori, L.F. Tomazini, E.M. Souza, F.O. Pedrosa, L.S. Chubatsu, M.A.S. Oliveira, The deuridylylation activity of *Herbaspirillum seropedicae* GlnD protein is regulated by the glutamine:2-oxoglutarate ratio, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1866 (2018) 1216–1223.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.09.009>.

- [24] A.C. Bonatto, E.M. Souza, M.A.S. Oliveira, R.A. Monteiro, L.S. Chubatsu, L.F. Huergo, F.O. Pedrosa, Uridylylation of herbaspirillum seropedicae glnB and glnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro, *Arch. Microbiol.* 194 (2012) 643–652. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0799-9>.
- [25] M.A.S. Oliveira, E.C.M. Gerhardt, L.F. Huergo, E.M. Souza, F.O. Pedrosa, L.S. Chubatsu, 2-Oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins, *FEBS J.* 282 (2015) 4797–4809. <https://doi.org/10.1111/febs.13542>.
- [26] C.E. Caban, A. Ginsburg, Glutamine Synthetase Adenylyltransferase from *Escherichia coli*: Purification and Physical and Chemical Properties, *Biochemistry.* 15 (1976) 1569–1580. <https://doi.org/10.1021/bi00652a030>.
- [27] P. Jiang, J.A. Peliska, A.J. Ninfa, 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 (1998) 12782–12794. <https://doi.org/10.1021/bi980667m>.
- [28] W.C. Van Heeswijk, S. Hoving, D. Molenaar, B. Stegeman, D. Kahn, H. V. Westerhoff, An alternative P(II) protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 133–146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6281349.x>.
- [29] A. Jonsson, P.F. Teixeira, S. Nordlund, The activity of adenylyltransferase in *Rhodospirillum rubrum* is only affected by α -ketoglutarate and unmodified PII proteins, but not by glutamine, in vitro, *FEBS J.* 274 (2007) 2449–2460. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05778.x>.
- [30] M. Johansson, S. Nordlund, Purification of P(II) and P(II)-UMP and in vitro studies of regulation of glutamine synthetase in *Rhodospirillum rubrum*., *J. Bacteriol.* 181 (1999) 6524–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515945> (accessed January 22, 2020).

- [31] J.I. Baldani, V.L.D. Baldani, L. Seldin, A.N.D.J. Dobereiner, a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium, *Int. J. Syst. BACTERIOLO.* 36 (1986) 86–93.
[https://doi.org/0020-7713/86/010086-08\\$02 .OO/O](https://doi.org/0020-7713/86/010086-08$02 .OO/O).
- [32] F.L. Olivares, E.K. James, J.I. Baldani, J. Döbereiner, Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*, *New Phytol.* 135 (1997) 723–737.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x>.
- [33] R.A. Monteiro, E. Balsanelli, R. Wassem, A.M. Marin, L.C.C. Brusamarello-Santos, M.A. Schmidt, M.Z. Tadra-Sfeir, V.C.S. Pankievicz, L.M. Cruz, L.S. Chubatsu, F.O. Pedrosa, E.M. Souza, *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects, *Plant Soil.* 356 (2012) 175–196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>.
- [34] V.C.S. Pankievicz, F.P. Do Amaral, K.F.D.N. Santos, B. Agtuca, Y. Xu, M.J. Schueller, A.C.M. Arisi, M.B.R. Steffens, E.M. De Souza, F.O. Pedrosa, G. Stacey, R.A. Ferrieri, Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association, *Plant J.* 81 (2015) 907–919.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12777>.
- [35] D.C. Persuhn, E.M. Souza, M.B. Steffens, F.O. Pedrosa, M.G. Yates, L.U. Rigo, The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*., *FEMS Microbiol. Lett.* 192 (2000) 217–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09385.x>.
- [36] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. Vol 2: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
<http://books.google.com.mx/books?id=VLGyXwAACAAJ> (accessed January 27, 2020).
- [37] R. Little, P. Salinas, P. Slavny, T.A. Clarke, R. Dixon, Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission, *Mol. Microbiol.* 82 (2011) 222–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07812.x>.

- [38] K.L. Heckman, L.R. Pease, Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 924–932.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>.
- [39] V.R. Moure, G. Razzera, L.M. Araújo, M.A.S. Oliveira, E.C.M. Gerhardt, M. Müller-Santos, F. Almeida, F.O. Pedrosa, A.P. Valente, E.M. Souza, L.F. Huergo, Heat stability of Proteobacterial P II protein facilitate purification using a single chromatography step, *Protein Expr. Purif.* 81 (2012) 83–88.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.008>.
- [40] R.A. Bender, K.A. Janssen, A.D. Resnick, M. Blumenberg, F. Foor, B. Magasanik, Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*, *J. Bacteriol.* 129 (1977) 1001–1009.
- [41] M.R. Atkinson, T.A. Blauwkamp, V. Bondarenko, V. Studitsky, A.J. Ninfa, Activation of the *glnA*, *glnK*, and *nac* promoters as *Escherichia coli* undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation., *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5358–63. <https://doi.org/10.1128/jb.184.19.5358-5363.2002>.
- [42] H.S. Kingdon, B.M. Shapiro, E.R. Stadtman, Regulation of glutamine synthetase. 8. ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58 (1967) 1703–1710.
<https://doi.org/10.1073/pnas.58.4.1703>.
- [43] B.M. Shapiro, H.S. Kingdon, E.R. Stadtman, Regulation of glutamine synthetase. VII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58 (1967) 642–649. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.2.642>.
- [44] C.A. Woolfolk, E.R. Stadtman, Cumulative feedback inhibition in the multiple end product regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17 (1964) 313–319.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(64\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(64)90003-8).
- [45] R.B. Helling, Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*., *J.*

Bacteriol. 180 (1998) 4571–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721297>
(accessed January 22, 2020).