

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LORENA GOMES POLIZELLI

Caracterização funcional dos domínios ACT
da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*

Maringá

2022

LORENA GOMES POLIZELLI

Caracterização funcional dos domínios ACT
da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira

Coorientador: Professor Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno

Maringá

2022

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

P769c

Polizelli, Lorena Gomes

Caracterização funcional dos domínios ACT da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae* / Lorena Gomes Polizelli. -- Maringá, PR, 2022.
81 f.: il. color., figs., tabs.

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

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno.

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

1. Metabolismo de nitrogênio. 2. Proteína GlnD. 3. *Herbaspirillum seropedicae*. I. Schuler de Oliveira, Marco Aurélio, orient. II. Bueno, Paulo Sérgio Alves, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572.84

FOLHA DE APROVAÇÃO

LORENA GOMES POLIZELLI

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS DOMÍNIOS ACT DA PROTEÍNA GlnD DE *Herbaspirillum Seropedicae*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas pela banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovada em: 15/07/2022

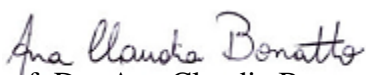
COMISSÃO JULGADORA



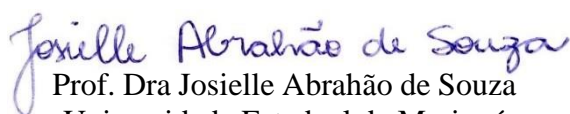
Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira (orientador)
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dra Rose Adele Monteiro
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dra Ana Claudia Bonatto
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dra Josielle Abrahão de Souza
Universidade Estadual de Maringá



Dr. Marco Antônio Seiki Kadowaki
Braskem S.A., biotecnologia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me dar forças para continuar sempre

Ao meu orientador, Professor Dr. Marco Aurélio, pela oportunidade, confiança e por todos esses anos de aprendizado. Sou muito grata pela paciência dedicada a mim

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria de Lourdes e meu irmão Vinícius pelo apoio incondicional, paciência, incentivo e amor

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Procariotos: Amanda, Ana Paula, Bárbara, Eduardo Lennyn, Eduardo Sabatine, Josi, Larissa Tomazini, Larissa Ricardini e Nunes, pela convivência diária e por toda colaboração durante esses 4 anos

Ao professor Paulo, pela colaboração essencial na modelagem computacional que sem dúvida agregou muito ao trabalho.

A todos os professores e técnicos do Departamento de Bioquímica

À Universidade Estadual de Maringá e COMCAP, pela estrutura e disponibilização de equipamentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo trabalho constante para permitir nossa formação.

Ao CNPq pelo suporte financeiro

E a todos que de alguma forma me ajudaram neste trabalho

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica e endofítica, ou seja, capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico, e se associar a tecidos internos de plantas sem causar danos ao hospedeiro. Estudos *in vivo* mostram que o nitrogênio fixado por esse microrganismo é incorporado na biomassa da planta e, além disso, essa bactéria contribui para o crescimento vegetal pela síntese de fitohormônios, sideróforos e solubilização de fosfatos. O processo de fixação de nitrogênio realizado pelos diazotrofos consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em formas mais reativas, as quais são assimiláveis por outros organismos, o que faz com que esse processo seja fundamental para a manutenção da vida. A fixação biológica de nitrogênio é fortemente regulada, e o sistema conhecido como Ntr participa dessa regulação. Esse sistema compreende um conjunto de enzimas com função de desencadear respostas ao nível de regulação da transcrição e controle da atividade de proteínas relacionadas com o metabolismo do nitrogênio. As proteínas PII são centrais no sistema Ntr, modulando a atividade de diversos alvos através de interações proteína-proteína, regulando-as de acordo com flutuações dos níveis de moléculas sinalizadoras do *status* de nitrogênio, carbono e energia. A bactéria *H. seropedicae* possui duas proteínas da família PII, GlnB, a qual é expressa constitutivamente, e GlnK, a qual tem sua expressão estimulada em condições limitantes de nitrogênio. Outra proteína que possui um papel importante nesse sistema é a enzima bifuncional GlnD, a qual atua como um controle central no metabolismo de nitrogênio determinado pelo nível de glutamina na célula, primeiro composto de nitrogênio orgânico derivado da assimilação do amônio. GlnD é responsável por controlar o estado de uridililação das proteínas da família PII, envolvidas na cascata de regulação da fixação de nitrogênio. Dentre os quatro domínios de GlnD, encontram-se dois domínios ACT C-terminais, os quais têm sido apontados como envolvidos no sensoriamento da glutamina.

Este trabalho é constituído por uma introdução geral e os resultados são apresentados na forma de dois artigos. No primeiro artigo, as proteínas GlnK, GlnD e as proteínas mutantes GlnD A713D, GlnD V766D, GlnD G817D, GlnD D822G e GlnD F824D foram purificadas e caracterizadas através de ensaios de uridililação e desuridililação *in vitro*. Os resultados sugerem fortemente que o domínio ACT parece conter um sítio de ligação de efetores, o qual é compartilhado entre glutamina e 2-OG. Neste sítio o resíduo de aminoácido A713 exerce um papel essencial na ligação desses

efetores. Além disso, também mostramos um papel do domínio ACT na sensibilidade aos nucleotídeos de adenina.

No segundo artigo, foram construídas versões truncadas de GlnD sem o domínio C-terminal, denominada GlnD Δ ACT, e também três pontos de truncagem apenas com o domínio C-terminal de GlnD, denominados GlnD ACT1, GlnD ACT2 e GlnD ACT3. Posteriormente, a regulação da atividade UR por efetores alostéricos dessas proteínas foi caracterizada. Mostramos que as três variantes conseguiram exercer uma função regulatória sobre o ciclo fútil catalisado por GlnD Δ ACT, com a variante truncada GlnD ACT1 apresentando melhor regulação.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, GlnD, metabolismo de nitrogênio

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic and endophytic bacterium capable of reducing atmospheric nitrogen, and associating with internal plant tissues without causing damage to the host. *In vivo* studies have shown that the nitrogen fixed by this microorganism is incorporated into the plant's biomass, and, in addition, this bacterium contributes to plant growth through the synthesis of phytohormones, siderophores and phosphate solubilization. The nitrogen fixation process performed by diazotrophs consists of converting atmospheric nitrogen into more reactive forms, which are assimilable by other organisms, what makes this process essential for the maintenance of life. The biological nitrogen fixation is tightly regulated, and the system known as Ntr participates in this regulation. This system comprises a set of enzymes that trigger responses at the transcription regulation level and control the activity of proteins related to nitrogen metabolism. PII proteins are central to the Ntr system, modulating the activity of several targets through protein-protein interactions, regulating them according to fluctuations in the levels of molecules that signal nitrogen, carbon and energy status. The bacterium *H. seropedicae* has two proteins of the PII family, GlnB, which is expressed constitutively, and GlnK, which has its expression stimulated under nitrogen-limiting conditions. Another protein that plays an important role in this system is the bifunctional enzyme GlnD, which acts as a central control in nitrogen metabolism determined by the level of glutamine in the cell, the first compound of organic nitrogen derived from the assimilation of ammonium. GlnD is responsible to control the uridylylation state of PII family proteins, involved in the nitrogen fixation regulation cascade. Among the four GlnD domains, there are two C-terminal ACT domains, which have been implicated in glutamine sensing.

This work has a general introduction and the results are presented in the form of two articles. In the first article, the GlnK, GlnD and the mutant proteins GlnD A713D, GlnD V766D, GlnD G817D, GlnD D822G and GlnD F824D were purified and characterized using *in vitro* uridylylation and deuridylylation assays. The results strongly suggest that the ACT domain appears to contain an effector binding site, which is shared between glutamine and 2-OG. In this site the amino acid residue A713 plays an essential role in binding these effectors. In addition, we also show a role of the ACT domain in sensitivity to adenine nucleotides. In the second article, truncated versions of GlnD were constructed without the C-terminal domain, named GlnD Δ ACT, and also three truncation

points with only the C-terminal domain of GlnD, called GlnD ACT1, GlnD ACT2 and GlnD ACT3. Subsequently, the regulation of UR activity by allosteric effectors of these proteins, were characterized with respect to UR activity by allosteric effectors. We show that all three variants were able to recover to exert a regulatory function on the futile cycle catalyzed by GlnD Δ ACT, with the truncated GlnD ACT1 variant showing better regulation.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*, GlnD, nitrogen metabolism

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
1. Introdução	1
1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	1
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	1
1.3 Sistema Ntr.....	2
1.3.1 Proteínas PII.....	3
1.3.2 Interação das proteínas PII com seus alvos.....	5
1.4 Proteína GlnD.....	7
1.4.1 Domínios de GlnD.....	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos gerais.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
Artigo 1: Insights sobre o mecanismo regulatório da proteína GlnD de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> utilizando uma abordagem de mutações sítio - dirigidas	
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Bactérias e plasmídeos.....	15
Meios de cultura e condições de crescimento.....	16
Mutagênese sítio – dirigida no fragmento gênico que codifica os domínios ACT.....	16
Transformação bacteriana.....	17
Manipulação do DNA.....	17
Superexpressão de proteínas.....	18
Purificação de proteínas recombinantes.....	18
Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	19
Eletroforese de proteínas em condições não desnaturantes (NATIVO).....	19

Obtenção das formas totalmente uridililadas de GlnK de <i>H. seropedicae</i>	20
Ensaio de uridililação e desuridililação de GlnK.....	20
Modelagem de GlnD.	20
RESULTADOS	21
Construção e clonagem dos genes contendo as mutações pontuais.	21
Purificação das proteínas	22
Regulação da atividade UTase da proteína GlnD e das proteínas com mutações pontuais de <i>H. seropedicae</i> por glutamina e 2-OG	23
Regulação da atividade UR das variantes da proteína GlnD por glutamina e 2-OG.....	25
Dependência dos nucleotídeos de adenina na regulação da atividade UTase	28
Dependência dos nucleotídeos de adenina na regulação da atividade UR.	29
Modelagem de GlnD.	31
DISCUSSÃO	34
MATERIAL SUPLEMENTAR.	39
Artigo 2: Regulação <i>in trans</i> da proteína GlnD de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> pelo domínio ACT	
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
Bactérias e plasmídeos.....	43
Meios de cultura e condições de crescimento.....	44
Reação em cadeia da polimerase	44
Manipulação do DNA.....	44
Superexpressão de proteínas.....	45
Purificação de proteínas recombinantes.	45
Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	46
Eletroforese de proteínas em condições não desnaturantes (NATIVO).....	46
Obtenção das formas totalmente uridililadas de GlnK de <i>H. seropedicae</i>	46
Ensaio de uridililação e desuridililação de GlnK.....	47
RESULTADOS	47

Construção dos pontos de truncagem dos domínios ACT.....	47
Clonagem dos genes codificadores das versões truncadas dos domínios ACT.	48
Purificação das proteínas	49
Uridililação catalisada por GlnD Δ ACT e pelas variantes truncadas.....	50
Regulação da atividade UR de GlnD Δ ACT pelos domínios truncados.	52
Construção, clonagem e purificação do gene mutante GlnD ACT1 A713D.....	53
Regulação da atividade UR do mutante truncado GlnD ACT A713D.....	55
DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da proteína PII de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5
Figura 2. Modelo de uridililação e desuridililação das proteínas PII catalisadas pela proteína GlnD em resposta à disponibilidade de nitrogênio.....	6
Figura 3. Esquema dos domínios estruturais da proteína GlnD de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	7
Artigo 1.	
Figura 1. Alinhamento dos domínios ACT de diversos organismos.....	14
Figura 2. Confirmação dos clones mutantes pontuais através de restrição com as enzimas <i>XbaI/BamHI</i>	22
Figura 3. Efeito do 2-OG na uridililação de GlnK	23
Figura 4. Efeito da glutamina na uridililação de GlnK.....	24
Figura 5. Efeito do 2-OG na desuridililação de GlnK-UMP ₃	26
Figura 6. Efeito da glutamina na desuridililação de GlnK-UMP ₃	27
Figura 7. Ensaios de desuridililação e uridililação catalisados por GlnD A713D.....	28
Figura 8. Efeito de ATP e ADP na uridililação de GlnK	29
Figura 9. Efeito de ATP e ADP na desuridililação de GlnK-UMP ₃	30
Figura 10. Efeito de ATP na desuridililação de GlnK-UMP ₃ catalisada por GlnD e GlnD D822G	31
Figura 11. Estrutura tridimensional da enzima GlnD de <i>H. seropedicae</i>	31
Figura 12. Domínio ACT.....	32
Figura 13. Simulações de <i>docking</i> molecular das moléculas glutamina e 2-OG na enzima GlnD selvagem de <i>H. seropedicae</i>	33
Figura 14. Possível cavidade de ligação para ATP (ou ADP).....	34
MATERIAL SUPLEMENTAR.	39

Figura 1. Eletroforese das mutações pontuais através de reações de PCR..... 39

Artigo 2.

Figura 1. Pontos de truncagem dos domínios ACT da proteína GlnD de *H. seropedicae*..... 48

Figura 2. Eletroforese dos fragmentos do gene *glnD* codificantes dos domínios ACT truncados..... 48

Figura 3. Confirmação dos clones dos pontos de truncagem GlnD ACT1, GlnD ACT2 e GlnD ACT3 49

Figura 4. Purificação das proteínas GlnD Δ ACT, GlnD ACT1, GlnD ACT2 e GlnD ACT3 49

Figura 5. Uridililação de GlnK catalisada por GlnD Δ ACT e pelas variantes truncadas 51

Figura 6. Regulação da atividade de desuridililação de GlnK-UMP₃ pelos efetores moleculares 2-OG e glutamina catalisada por GlnD selvagem, GlnD Δ ACT, ACT1, ACT2 e ACT3. 52

Figura 7. Avaliação da influência dos nucleotídeos ATP e ADP na regulação da atividade de desuridililação de GlnK-UMP₃ pelos efetores 2-OG e glutamina catalisada por GlnD Δ ACT + ACT1..... 53

Figura 8. Eletroforese do fragmento do gene *glnD* codificante do mutante truncado ACT A713D 53

Figura 9. Confirmação da clonagem do mutante truncado GlnD ACT A713D..... 54

Figura 10. Purificação do mutante truncado GlnD ACT A713D 54

Figura 11. Efeito da glutamina na desuridililação de GlnK-UMP₃ catalisada por GlnD Δ ACT, GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 e GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 A713D 55

Figura 12. Efeito do 2-OG na desuridililação de GlnK-UMP₃ catalisada por GlnD Δ ACT, GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 e GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 A713D 56

LISTA DE TABELAS

Artigo 1.

Tabela 1. Bactérias e plasmídeos..... 15

Tabela 2. Composição dos meios de cultura LB e LA 16

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....17

Artigo 2.

Tabela 1. Bactérias e plasmídeos43

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....44

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG – 2 oxoglutarato

ACT – Domínio C-terminal de GlnD

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Bovine serum albumin

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nanômetros

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra – acético

FeMo-co – Cofator ferro molibdênio

GOGAT – Glutamato sintase

GS – Glutamina sintetase

HD – Domínio Central de GlnD

IPTG – Isopropil β – D – 1 – tiogalactopiranosídeo

kDa – Kilodalton

LA – Meio de cultura Luria – Bertani com ágar

LB – Meio de cultura Luria – Bertani

NT – Domínio N – terminal de GlnD

Ntr – Nitrogen Regulation System

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TEMED – Tetrametiletlenodiamina

Tyr – Aminoácido tirosina

UMP – Uridina monofosfato

UR – Uridilil removedora

UTase – Uridilil transferase

UTP – Uridina trifosfato

1. Introdução

1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio constitui 78% da atmosfera na forma de dinitrogênio (N_2) (Yurgel *et al.*, 2012) mas, nessa forma, não é assimilável para a maioria dos seres vivos. Para a sobrevivência dos seres vivos, esse elemento é necessário para sintetizar biomoléculas essenciais como proteínas e ácidos nucleicos. Para o desenvolvimento dos vegetais, é um nutriente limitante do crescimento das plantas na maioria dos ambientes. Por essa razão, as práticas agrícolas comuns utilizam grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados para manter a alta produtividade das culturas, e seu uso excessivo pode ter efeitos maléficos no meio ambiente através de emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera, escoamento químico nos cursos de água e acidificação do solo (Dixon e Kahn, 2004). Apenas um pequeno grupo de procariotos, denominados diazotrofos, é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico ao amônio, em um processo que demanda energia, chamado fixação biológica de nitrogênio (Dixon e Kahn, 2004).

A redução do dinitrogênio a amônio por bactérias fixadoras de nitrogênio, é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase, cujos componentes centrais são duas metaloenzimas: a dinitrogenase, também conhecida como proteína MoFe ou NifDK e a dinitrogenase-redutase, também conhecida como proteína Fe ou NifH (Dixon e Kahn, 2004). A atividade da nitrogenase pode ser regulada nos níveis transcricional e pós-traducional, e os dois principais sinais ambientais que regulam a nitrogenase nas proteobactérias são os níveis celulares de oxigênio e nitrogênio (Dixon e Kahn, 2004). A regulação dos níveis de oxigênio é necessária devido à sensibilidade da nitrogenase a esse elemento, enquanto que a regulação dos níveis de nitrogênio garante que a nitrogenase funcione apenas quando necessário (Huergo *et al.*, 2012).

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, foi inicialmente caracterizada por Baldani *et al.* (1986) como sendo uma bactéria fixadora de nitrogênio encontrada em associação com gramíneas economicamente importantes como cana-de-açúcar, arroz milho e sorgo. *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, vibrióide, membro da classe β do filo proteobactérias, e considerada um microrganismo endofítico, ou seja, capaz de colonizar

tecidos internos de plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Baldani *et al*, 1986; Olivares *et al*, 1997).

Através de atração pelas raízes, as quais fornecem fontes de carbono para as bactérias, e posterior fixação às superfícies radiculares seguida da colonização das raízes laterais, a associação de *H. seropedicae* com plantas faz com que essa bactéria tenha potencial como um promotor de crescimento vegetal (Monteiro *et al*, 2012). Quando inoculado com *H. seropedicae*, o arroz apresentou aumento no peso seco (22% a 50%), no conteúdo total de carbono (15% a 50%) e no conteúdo total de nitrogênio (29% a 85%) 30 dias após a inoculação (Gyaneshwar, *et al*, 2002). Evidências também mostram uma resposta à inoculação de *H. seropedicae* com incorporação na biomassa da planta hospedeira, produção de sementes e crescimento da raiz (Pankiewicz *et al*, 2015). Além disso, este organismo também pode contribuir para o crescimento da planta pela produção de fito- hormônios (Bástian *et al*, 1998).

1.3 Sistema Ntr

Os organismos precisam adaptar-se constantemente às mudanças no meio nutricional e, para isso, necessitam de sistemas moleculares para sensoriar essas mudanças, e conseqüentemente modular o metabolismo em resposta a elas. O sistema Ntr (“Nitrogen regulation system”) de bactérias compreende proteínas que atuam em conjunto com a finalidade de adaptar o metabolismo de acordo com a quantidade e qualidade das fontes disponíveis de nitrogênio no ambiente, desencadeando respostas de regulação e controle da atividade de proteínas (Merrick & Edwards, 1995; Chubatsu *et al*, 2012). O sistema Ntr é formado por diversas proteínas, dentre elas: a enzima glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*), o sistema de dois componentes NtrB – NtrC (produto dos genes *ntrB* e *ntrC*), as enzimas bifuncionais GlnD (UTase/UR) e GlnE (ATase) (produtos dos genes *glnD* e *glnE* respectivamente), as proteínas do tipo PII (GlnB e GlnK) (produtos dos genes *glnB* e *glnK*) e a proteína de membrana AmtB (produto do gene *amtB*).

1.3.1 Proteínas PII

Para serem capazes de lidar com as variações na disponibilidade de carbono e nitrogênio, as bactérias possuem sistemas de transdução de sinais para detectar o estado nutricional predominante e assim, gerar uma resposta metabólica apropriada (Huergo e Dixon, 2015).

As proteínas PII foram identificadas em 1969 durante os estudos de modificação pós-traducional da enzima de GS (glutamina sintetase) de *Escherichia coli* (Shapiro, 1969). Essas proteínas possuem um papel central no sistema Ntr e constituem uma das mais amplamente distribuídas famílias de proteínas de transdução de sinal na natureza, com representantes em *archaea*, bactérias, e também no cloroplasto de algas eucarióticas e plantas superiores, porém, não são encontradas em fungos ou animais (Forchhammer, 2008; Sant'Anna *et al.*, 2009). Para controlar o metabolismo celular, as proteínas desta família são capazes de sensoriar e integrar diversos sinais metabólicos diferentes que refletem o status de nitrogênio, energia e carbono, sinalizados, respectivamente, por glutamina, razão ATP/ADP e 2-OG, integrando-os e transmitindo esses sinais para diversos alvos proteicos envolvidos no sistema geral de regulação de nitrogênio (Ntr) (Arcondéguy *et al.* 2001; Truan *et al.*, 2010).

Arcondéguy e colaboradores (2001), propuseram uma nomenclatura para descrever os membros da família PII, na qual os subgrupos principais foram denominados *glnB*, *glnK* (e em alguns casos, os parálogos de *glnK* denominados *glnZ* ou *glnJ*) e *nifI*, baseados na conservação da ligação genética e similaridade ao nível da sequência de aminoácidos primários. O gene *glnB* foi descrito por estar ligado a *glnA* (gene estrutural GS) ou *nadE* (codificador da NAD sintetase); *glnK* foi usada para os genes de PII que estavam ligados a *amtB* (o gene estrutural para a proteína do canal de amônia); e *nifI* (somente em *archaea*), para genes semelhantes à PII associados aos genes estruturais da nitrogenase (*nifH*, *nifD* e *nifK*). Além desses, Sant'Anna e colaboradores (2009) também descreveram um grupo não caracterizado de homólogos de PII, denominado de PII- New Group (PII-NG).

A bactéria *H. seropedicae* possui duas proteínas PII, GlnB e GlnK, que compartilham 78% de identidade de sequência de aminoácidos (Benelli *et al.*, 1997; Noindorf *et al.*, 2006). O gene *glnB* é monocistrônico e sua expressão é constitutiva, enquanto o gene *glnK* é cotranscrito com o gene *amtB* (que codifica para a proteína

transportadora de amônio AmtB) e *nlnA* (codifica uma proteína associada à membrana de função desconhecida), formando o operon *nlnAglnKamtB* (Noindorf *et al*, 2006).

Com relação ao metabolismo de nitrogênio, as proteínas PII participam do processo de regulação da expressão gênica modulando a atividade de fatores de transcrição, como o NtrC (Merrick & Edwards, 1995), controlam o fluxo de nitrogênio através da proteína de transporte de amônio (AmtB) (Coutts *et al*, 2002), influenciam a assimilação de amônio (glutamina sintetase) (Jiang & Ninfa, 2007; Forchhammer, 2008), e participam da regulação do processo de fixação do nitrogênio pela regulação da atividade da proteína NifA e nitrogenase (Merrick & Edwards, 1995; Dixon e Kahn, 2004; Noindorf *et al*, 2011). Em *Synechococcus elongatus* e *Arabidopsis thaliana*, ocorre uma interação das proteínas PII com NAGK, uma enzima controladora da biossíntese de arginina (Llacer *et al*, 2007). Além disso, as proteínas PII também já foram descritas como associadas ao metabolismo de carbono na biossíntese de ácidos graxos através da identificação da acetil-CoA carboxilase em *Arabidopsis thaliana* (Feria Bourrellier *et al*, 2010; Gerhardt *et al*, 2015). Porém, muito além da regulação do metabolismo de nitrogênio e carbono, as proteínas PII também já foram descritas por regular a produção de metabólitos de sinalização em *A. brasilense* (c-di-GMP) (Gerhardt *et al*, 2020), e permitir o controle da biossíntese de NAD⁺ de acordo com o estado nutricional da célula bacteriana (Santos *et al*, 2020).

As proteínas PII são homotrímeros de subunidades de 12 kDa, com uma estrutura altamente conservada. O trímero de PII possui forma de um barril compacto, no qual cada monômero possui duas α hélices e quatro folhas β formando um motivo duplo $\beta\alpha\beta$ conectado por um *loop* de 19 aminoácidos que contém um local para modificação pós-traducional (Ninfa & Atkinson, 2000; Forchhammer, 2008). Inicialmente caracterizado em *E. coli*, onde o resíduo Tyr51 está sujeito a uridililação (Son & Rhee, 1987), este *loop* foi denominado *loop-T* (Cheah *et al.*, 1994). Além dos *loops T*, as proteínas PII também são apresentadas por três fendas laterais, dentro das quais existem dois loops menores (os loops B e C) (Radchenko & Merrick, 2011). (Figura 1).

Dentro do trímero de PII, os *loops T* e B 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 (Huerigo *et al*, 2012). O *loop-T* foi descrito por apresentar estrutura flexível, uma característica importante para oferecer maior facilidade para interação com proteínas alvo. Além disso, os trímeros podem adotar diferentes

conformações, dependendo da presença ou não de ligantes à PII (Llacer *et al*, 2007; Forchhammer, 2008).

Além da uridililação, as proteínas PII de alguns organismos estão sujeitas à outras modificações pós-traducionais, como a adenililação ou a fosforilação. Em actinobactérias como *Corynebacterium glutamicum*, PII é adenililada em resposta à falta de nitrogênio, desadenililada quando o suprimento de nitrogênio aumenta; ambos os processos dependem da proteína GlnD (Strosser *et al*, 2004). A outra modificação ocorre em cianobactérias como *S. elongatus*, e neste caso, o *loop-T* está sujeito a fosforilação no resíduo Ser49 (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1994). Nos três casos, a modificação das proteínas é influenciada pelo *status* de nitrogênio celular.

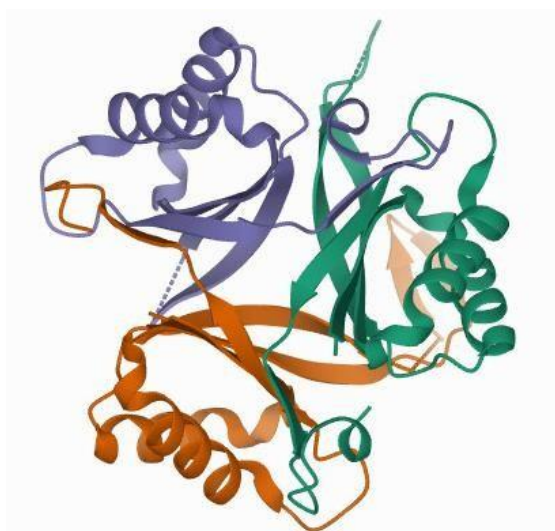


Figura 1 – Estrutura tridimensional da proteína PII de *Herbaspirillum seropedicae*. As três cadeias da proteína estão diferenciadas em roxo, verde e laranja (Benelli *et al*, 2002).

1.3.2 Interação das proteínas PII com seus alvos

O estado conformacional de PII é regulado pela ligação alostérica das moléculas efetoras, ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG), ou pela modificação covalente reversível (uridililação) de um resíduo de tirosina-51 conservado no *loop-T* (Xu *et al*, 1998; Forchhammer, 2008).

Em algumas bactérias Gram-negativas, como *H. seropedicae*, as proteínas PII são covalentemente modificadas por uridililação pós traducional (adição de um grupamento UMP) no resíduo de tirosina 51 no *loop-T* em resposta aos níveis de nitrogênio, e essa regulação é catalisada pela enzima bifuncional GlnD uridililtransferase/removedora. Em

condições limitantes de nitrogênio, ou seja, baixa glutamina intracelular, GlnD tem sua atividade uridililtransferase estimulada, catalisando a adição de um grupamento UMP a cada subunidade do trímero de PII. Por outro lado, em condições de excesso de nitrogênio, os níveis de glutamina aumentam e GlnD catalisa a desuridililação de PII (Jiang *et al*, 1998; Bonatto *et al*, 2007) (Figura 2).

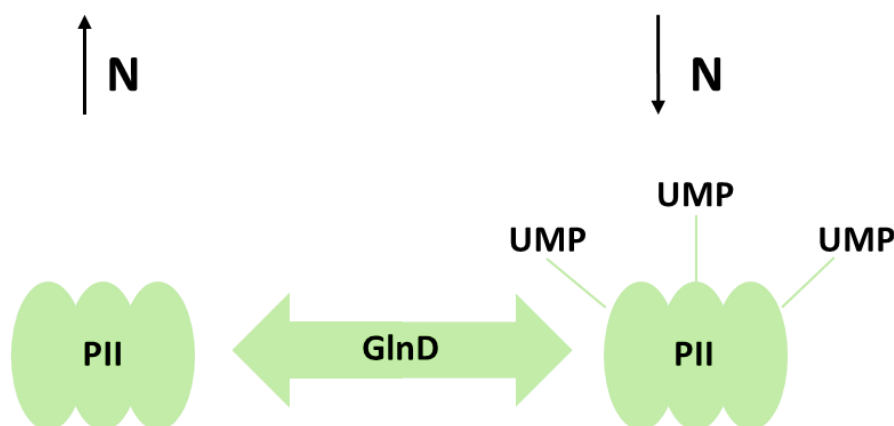


Figura 2: Modelo de uridililação e desuridililação das proteínas PII catalisadas pela proteína GlnD em resposta à disponibilidade de nitrogênio. Em condições limitantes de nitrogênio, a atividade UTase de GlnD é estimulada, adicionando um grupo UMP de um UTP a cada subunidade do trímero PII. Por outro lado, em condições de suficiência de nitrogênio, a atividade UR é estimulada, removendo grupamentos UMP de PII.

Além da modificação pós-traducional pela uridililação, as proteínas PII também podem ser reguladas pela ligação a efetores moleculares, como ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG), que desempenham um papel fundamental na modulação da conformação dos *loops-T* e, conseqüentemente, regulam as interações entre as proteínas PII e seus alvos (Jiang *et al*, 1998; Arcondéguy *et al*, 2001; Radchenko & Merrick, 2011).

Cada trímero de PII possui três sítios para ligação de ATP ou ADP e 2-OG, e a ligação desses efetores apresenta cooperatividade negativa (Arcondéguy *et al*, 2001; Jiang & Ninfa, 2007). Como o ATP e o ADP competem pelo mesmo sítio de ligação, isso permite a essas proteínas monitorar os níveis energéticos da célula (Xu *et al*, 2001; Jiang & Ninfa, 2007). Por outro lado, o sítio de ligação para o 2-OG é formado após a ligação de ATP; a qual envolve a coordenação de um íon Mg^{2+} (Truan *et al*, 2010).

1.4 Proteína GlnD

GlnD é uma proteína bifuncional que apresenta atividades enzimáticas com 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, como descrito anteriormente. GlnD é o sensor primário do *status* de nitrogênio na célula por ter a capacidade de detectar o nível de glutamina em bactérias, desempenhando um papel importante na assimilação e metabolismo do nitrogênio e regulando reversivelmente a modificação da proteína PII, que por sua vez, regula diversas proteínas por interação proteína-proteína (Zhang *et al*, 2010).

A atividade UTase de GlnD parcialmente purificada foi relatada pela primeira vez por Brown *et al.* 1971, que mostrou a conversão de PII em PII-UMP na presença de ATP, 2-oxoglutarato (2-OG) e UTP, e essa atividade foi inibida pela glutamina. Por outro lado, a atividade UR foi relatada por Mangum e colaboradores em 1973 como sendo estimulada por glutamina.

1.4.1 Domínios de GlnD

A proteína GlnD de *H. seropedicae* tem uma massa molecular de cerca de 97kDa, e possui 4 domínios: um domínio N-terminal nucleotidiltransferase (NT); um domínio central (HD), e dois domínios C-terminais ACT.

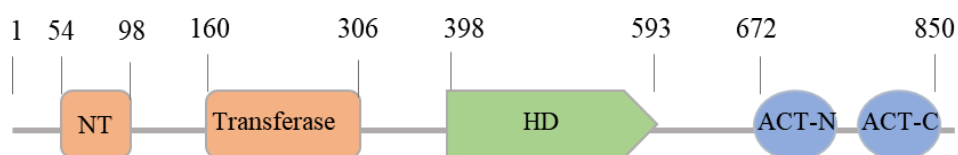


Figura 3. Esquema dos domínios estruturais da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*. Os números indicam a posição do aminoácido inicial e final de cada domínio (Esquema montado através de análise *in silico* com a ferramenta *online* InterPro)

O domínio nucleotidiltransferase (NT) N-terminal foi demonstrado como responsável pela atividade UTase em *E. coli* e *R. rubrum* (Zhang *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2005). Este domínio apresenta resíduos conservados de glicina e aspartato em sua estrutura primária, os quais estão envolvidos na ligação de íons metálicos Mg^{2+} , essenciais para a catálise do substrato (Zhang *et al*, 2010).

O domínio HD relaciona-se à uma superfamília de enzimas com atividade fosfohidrolase envolvidas no metabolismo dos ácidos nucleicos e na transdução de sinais. A principal característica deste domínio é a presença de resíduos quelantes de metais, geralmente histidina (H) ou aspartato (D) (origem de sua denominação) (Aravind & Koonin, 1998). Estudos realizados por Zhang e colaboradores (2010) utilizando versões de GlnD mutantes de *E. coli* mostraram que o domínio HD é essencial para a atividade UR, pois sua deleção elimina completamente essa atividade e tem pouco efeito sobre a atividade da UTase. Esses dados indicam que as atividades UR e UTase não compartilham o mesmo sítio ativo e, por essas reações serem catalisadas por domínios distintos da proteína, pode-se afirmar que a reação de desuridililação não é apenas a reversão da reação de uridililação.

Dois domínios ACT C-terminais, cuja abreviação é devida aos três tipos de enzimas bacterianas nas quais é encontrado (Aravind & Koonin 1999): aspartoquinase (AK), corismato mutase e pré-fenato desidrogenase (TyrA). A primeira estrutura de um domínio ACT foi determinada por Schuller e colaboradores em 1995 com a estrutura cristalina de D-3- fosfoglicerato desidrogenase de *E. coli*, e os domínios ACT foram encontrados principalmente em enzimas funcionalmente envolvidas no metabolismo de aminoácidos e purinas (Aravind and Koonin, 1999), apontando para uma função reguladora conservada desses domínios (Tondervik *et al*, 2006). Variantes de GlnD mutantes de *E. coli* nos domínios ACT C-terminais apresentaram menores atividades UTase, sugerindo que esses domínios podem estar envolvidos em parte dessa regulação, além de também estarem envolvidos na regulação UR, evitando um ciclo fútil de uridililação e desuridililação (Zhang *et al*, 2010). Este ciclo fútil foi demonstrado por Emori e colaboradores (2018) através da verificação da taxa de uridililação de GlnK em diferentes concentrações de UTP por uma variante de GlnD de *H. seropedicae* denominada GlnD Δ ACT. Com uma concentração baixa de UTP, a proteína GlnK é primeiro uridililada e depois totalmente desuridililada, como uma consequência do consumo do substrato UTP. Por outro lado, quanto maior a concentração de UTP usada, mais tempo GlnK permaneceu uridililada. Desse modo, enquanto houver UTP suficiente, GlnD Δ ACT catalisa o ciclo fútil de uridililação / desuridililação, demonstrando o papel regulatório deste domínio, através de uma regulação recíproca das atividades UR e UTase.

Devido à importância da proteína do presente estudo, GlnD, por exercer um papel importante na regulação do metabolismo do nitrogênio, o entendimento de seu mecanismo de regulação através de seus domínios torna-se fundamental. Diversos trabalhos sobre o metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae* revelaram vários aspectos sobre a regulação do mesmo. Recentemente nosso laboratório determinou o papel dos domínios ACT na regulação da proteína GlnD de *H. seropedicae*, porém, a regulação por esses domínios necessita uma melhor caracterização dos pontos de vista estrutural e funcional. Este trabalho buscou contribuir com os conhecimentos relacionados a esta regulação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Caracterizar funcionalmente os domínios ACT da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*.

3.2 Objetivos específicos

1. Clonagem, expressão e purificação dos domínios ACT da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*.
2. Realizar mutações pontuais nos domínios ACT e avaliar o efeito dos efetores glutamina e 2-OG
3. Avaliar o efeito estimulatório de 2-OG, e o efeito inibitório da glutamina sobre a uridililação da proteína GlnK;
4. Avaliar o efeito estimulatório da glutamina e o efeito inibitório de 2-OG sobre a desuridililação de GlnK
5. Avaliar o perfil de uridililação e desuridililação da proteína GlnK na presença das moléculas efetoras ATP e ADP.
6. Testar a capacidade dos domínios ACT em regular *in trans* a atividade da proteína GlnD Δ ACT.

ARTIGO 1. Insights sobre o mecanismo regulatório da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae* utilizando uma abordagem de mutações sítio-dirigidas

ABSTRACT

In this work, we characterize the regulation of the *in vitro* uridylation and deuridylylation activities of point mutant variants of the *H. seropedicae* GlnD protein. For this study, GlnK and GlnK-UMP₃ proteins were subjected to kinetic analysis of uridylylation and deuridylylation, respectively, catalyzed by purified GlnD variants. With the exception of the GlnD A713D mutant, which apparently presented deuridylation activity stimulated by 2-oxoglutarate, the activity of the mutants GlnD V766D, GlnD G817D, GlnD D822G and GlnD F824D was stimulated by glutamine and repressed by 2-oxoglutarate. On the other hand, uridylylation activity was stimulated by 2-oxoglutarate and inhibited by glutamine in all tested cases. We also analyzed the effect of adenosine nucleotides on uridylylation and deuridylylation of GlnK. In the first case, ATP and ADP were equally effective in stimulating the uridylylation of GlnK catalyzed by wild-type and mutant GlnD, and low activity was observed in the absence of these nucleotides, with the exception of the V766D variant, which showed equal activity in ATP, ADP and in the absence of these nucleotides. Interestingly, the GlnD D822G mutant showed intense activity in the absence of ATP and ADP. The results presented here confirm the importance of the GlnD protein in sensing the glutamine: 2-OG ratio.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento químico indispensável para todos os organismos vivos, constituindo 78% da atmosfera na forma de dinitrogênio (N₂) (Yurgel *et al*, 2012). Em bactérias, o sistema Ntr (“Nitrogen regulation system”) compreende proteínas que atuam com a finalidade de adaptar o metabolismo de acordo com a quantidade e qualidade das fontes disponíveis de nitrogênio no ambiente. Este sistema permite a expressão ou repressão de genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, desencadeando respostas de regulação e controle da atividade de proteínas (Merrick & Edwards, 1995; Chubatsu *et al*, 2012).

Através de interações proteína-proteína, as proteínas PII desempenham um papel central no sistema Ntr, regulando o metabolismo de nitrogênio e assimilação em resposta ao estado de nitrogênio percebido pela célula (Shetty *et al*, 2010). PII são homotrímeros com monômeros compostos por 112 resíduos de aminoácidos relacionados a transdução de sinal, em virtude de sua capacidade de regular a atividade de proteínas-alvo através da interação proteína-proteína. Entre os alvos estão proteínas de membrana, enzimas e fatores de transcrição envolvidos no metabolismo do nitrogênio (Huergo *et al*, 2012). *Herbaspirillum seropedicae*, bactéria objeto do presente trabalho, codifica duas proteínas PII, GlnB e GlnK, as quais são reguladas através de ligação alostérica a efetores moleculares e por modificação pós traducional. Cada trímero de PII possui três sítios para ligação de ATP ou ADP e 2-OG, (Arcondéguy *et al*, 2001). O ATP e o ADP competem pelo mesmo sítio de ligação, o que permite a essas proteínas monitorar os níveis energéticos da célula (Xu *et al*, 2001; Jiang & Ninfa, 2007). O sítio de ligação para o 2-OG é formado após a ligação de ATP; a qual envolve a coordenação de um íon Mg^{2+} (Truan *et al*, 2010). Desse modo, 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.

Outro modo de regulação da interação entre a proteína PII e seus alvos é através da uridililação (adição de um grupamento UMP) no resíduo de tirosina 51 no *loop*-T em resposta aos níveis de nitrogênio (Jiang *et al*, 1998). O estado de modificação pós-traducional é determinado pela atividade da enzima bifuncional GlnD uridilil-transferase/removedora. Em condições limitantes de nitrogênio, GlnD tem sua atividade uridilil-transferase (UTase) estimulada, catalisando a adição de um grupamento UMP às proteínas PII. Por outro lado, em condições de excesso de nitrogênio, os níveis intracelulares de glutamina caem e GlnD catalisa a desuridililação de PII (UR) (Bonatto *et al*, 2007). Ao controlar reversivelmente a modificação da proteína PII, a proteína GlnD atua como um sensor primário do status de nitrogênio na célula por ter a capacidade de detectar o nível de glutamina em bactérias, desempenhando assim, um papel importante na assimilação e metabolismo do nitrogênio (Zhang *et al*, 2010).

A proteína GlnD de *H. seropedicae* tem uma massa molecular de cerca de 97kDa e possui 4 domínios: um domínio N-terminal nucleotidiltransferase (NT) com atividade uridilil-transferase; um domínio central (HD) com atividade uridilil-removedora, e dois domínios C-terminais ACT (aspartato quinase-corismato mutase-TyrA). O controle

recíproco das atividades UTase e UR de GlnD é essencial para evitar o ciclo fútil de uridililação e desuridililação de consumo de energia das proteínas PII, visto que as reações são catalisadas por domínios distintos da proteína (Emori *et al*, 2018)

H. seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio encontrada em associação com espécies gramináceas economicamente importantes como cana-de-açúcar, arroz e milho (Baldani *et al*, 1986). Além disso, é capaz de colonizar os tecidos internos da planta sem causar dano ao hospedeiro, ou seja, é um organismo endofítico (Olivares *et al*, 1997). A regulação da atividade de uridililação (UTase) (Bonatto *et al*, 2007), bem como a atividade de deruridililação (UR) (Emori *et al*, 2018) de GlnD de *H. seropedicae*, está bem documentada. No presente trabalho, nós utilizamos uma abordagem de mutagênese sítio-dirigida dos domínios ACT da enzima GlnD de *H. seropedicae* para estudar os seus mecanismos regulatórios. Os aminoácidos escolhidos para mutagênese são altamente conservados entre proteínas GlnD de diversos organismos; assim, seria possível encontrar resíduos de aminoácidos que estivessem relacionados com os mecanismos regulatórios comuns das atividades catalíticas UTase e UR de GlnD. Os mutantes construídos e analisados nesse trabalho foram A713D, V766D, G817D, D822G e F824D (Figura 1). As proteínas contendo as mutações foram superexpressas e purificadas, e suas atividades UR e UTase sobre a proteína GlnK de *H. seropedicae* foram avaliadas.

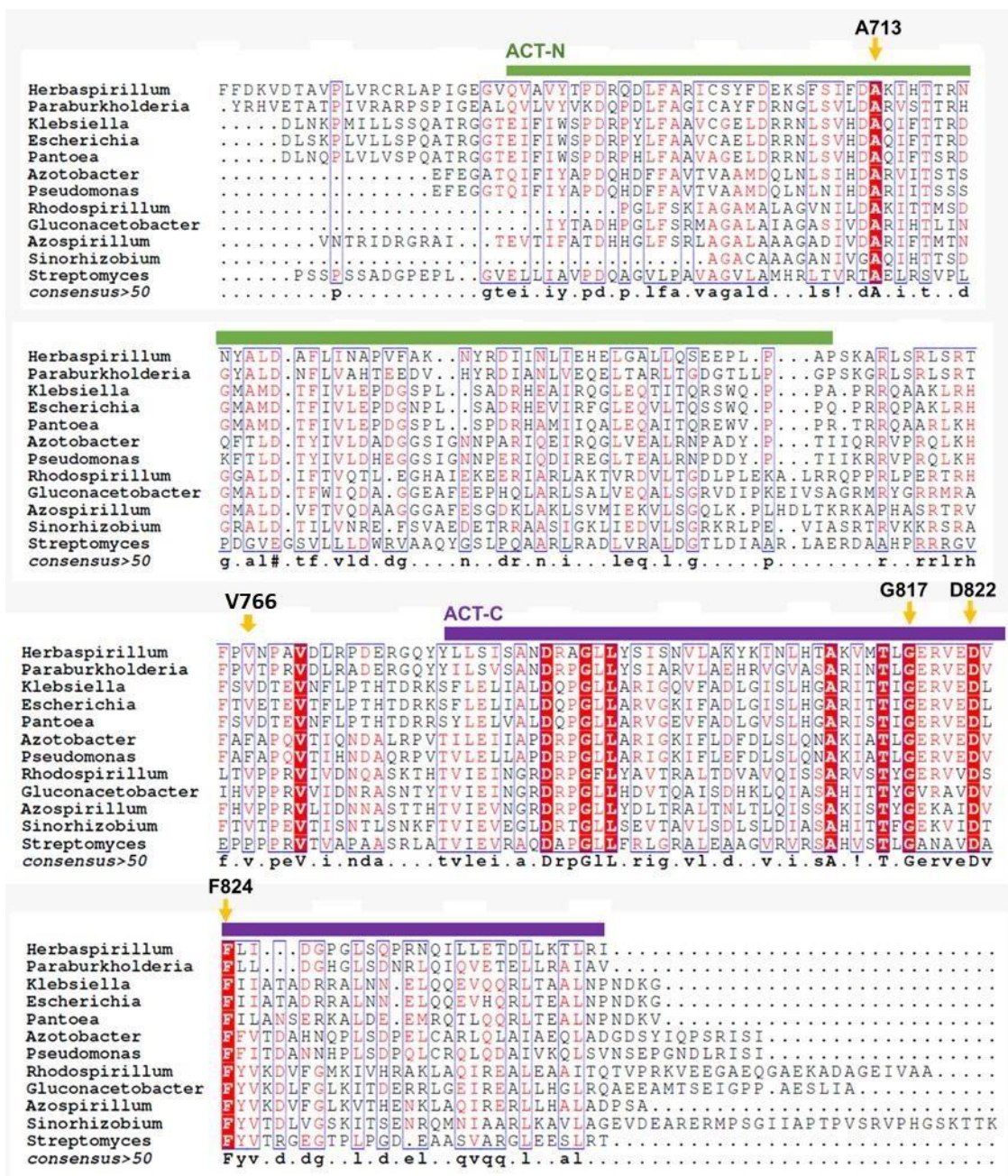


Figura 1. Alinhamento dos domínios ACT de diversos organismos. Os aminoácidos destacados com flecha amarela são os que foram escolhidos para sofrer mutagênese sítio dirigida devido à sua conservação na proteína GlnD. Os domínios ACT-N e ACT-C estão marcados com as barras verde e roxa, respectivamente (Alinhamento realizado na plataforma *online* Esript3).

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias e plasmídeos

Tabela 1. Bactérias e plasmídeos

Estirpe ou plasmídeo	Fenótipo e/ou genótipo	Referência
Estirpes de <i>E. coli</i>		
BL21 (DE3) pLysS	<i>hsdS gal</i> (λ cIts 857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>) (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs)	Sambrook <i>et al</i> , 1989
Top10	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mvr – hrd RMS – mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ ML5 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (<i>ara – leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
Plasmídeos		
pETNdeM-11	Vetor de expressão. Expressa a proteína de fusão com His-Tag/ promotor T7	Little <i>et al</i> , 2011
pEMB200	Km ^R , <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, pT7	Bonatto <i>et al</i> , 2007
pGH2	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, pT7	Bonatto <i>et al</i> , 2007
pGlnDA713D-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação no resíduo de aminoácido 713	Este trabalho
pGlnDV766D-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação no resíduo de aminoácido 766	Este trabalho
pGlnDG817D-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação no resíduo de aminoácido 817	Este trabalho
pGlnDD822G-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação no resíduo de aminoácido 822	Este trabalho
pGlnDF824D-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação no resíduo de aminoácido 824	Este trabalho

Meios de cultura e condições de crescimento

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C no meio líquido Luria-Bertani (LB), e o meio sólido utilizado foi Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook *et al*, 1989) (Tabela 1).

Tabela 2. Composição dos meios de cultura LB e LA

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

Mutagênese sítio-dirigida no fragmento gênico que codifica os domínios ACT

Para a construção das variantes gênicas com mutações pontuais foi utilizada uma estratégia dirigida por oligonucleotídeos conforme descrita por Ho *et al*, 1989. Nessa estratégia de mutagênese sítio dirigida, primers complementares à uma região do gene contendo um erro de pareamento, que introduzem a mutação desejada, foram desenhados. Utilizando o DNA plasmidial de GlnD como molde, o gene a ser mutagenizado foi amplificado, com dois conjuntos de primers separados: um primer flanqueador complementar à região 5' com um primer mutagênico 3', e um primer mutagênico 5' com um primer flanqueador 3'. Os primers mutagênicos 5' e 3' são complementares entre si. Os dois produtos dessas reações foram misturados e usados como molde para uma nova reação de PCR, usando os primers flanqueadores 5' e 3' não mutagênicos. O produto dessa reação (PCR *overlapping*) consistia no gene *glnD* inteiro contendo a mutação desejada.

A seleção dos aminoácidos a serem mutagenizados foi feita a partir da análise de resíduos de aminoácidos conservados na estrutura que possivelmente estão associados com a transdução do sinal do domínio ACT para os outros domínios da proteína, ou que ligam efetores alostéricos.

Tabela 3 – Lista de oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR

Oligonucleotídeos	Sequência 5' -3'
GlnD A713D_Fwd	CCACCCGCAACAATTACGACCTGGACGCC
GlnD A713D_Rev	GGCGTCCAGGTCGTAATTGTTGCGGGTGG
GlnD V766D_Fwd	CCTTCCCGGACAATCCGGCGGTG
GlnD V766D_Rev	CCTTCCCGGACAATCCGGCGGTG
GlnD G817D_Fwd	GATGACCCTGGATGAGCG
GlnD G817D_Rev	CGCTCATCCAGGGTCATC
GlnD D822G_Fwd	GGTGGAAGGTGTCTTCCT
GlnD D822G_Rev	AGGAAGACACCTTCCACC
GlnD F824D_Fwd	GACGTCGACCTCATCGAT
GlnD F824D_Rev	ATCGATGAGGGTCGACGTC
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Transformação bacteriana

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

Manipulação do DNA

A purificação de plasmídeos foi realizada através do método de lise alcalina. 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 (1989).

As sequências codificadoras dos genes de interesse amplificado foram digeridas com enzimas de restrição específicas. Para a clonagem do gene *glnD*, as soluções contendo o gene e o vetor pETM11 foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Após a digestão, as enzimas de restrição foram inativadas a 80°C por 20 minutos, o DNA foi purificado, e as reações de ligação foram realizadas nas condições específicas de cada enzima, de acordo com orientação do fabricante.

Superexpressão de proteínas

O plasmídeo contendo o gene codificador da proteína a ser purificada sob controle do promotor T7, ou seja, o clone positivo, foi transformado na estirpe BL21(DE3) de *E. coli*. A expressão da proteína foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 3 horas a 37°C (para GlnK) e overnight a 18°C para GlnD. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação e o *pellet* estocado a -20°C até o momento do uso. O resultado da expressão foi visualizado pela eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

Purificação de proteínas recombinantes

Para a purificação, as células contendo as proteínas superexpressas foram lisadas por sonicação, e o extrato clarificado por centrifugação para a obtenção da fração de proteínas solúveis.

A proteína GlnK foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica (Heparina) (GE – healthcare). Como o trímero de PII é uma molécula estável com uma temperatura de fusão entre 60 e 70 °C, esta estabilidade ao calor é usada para facilitar a purificação de PII (Moure *et al*, 2012). As proteínas GlnD foram purificadas utilizando uma coluna de afinidade Hi-Trap Chelating HP (GE – healthcare) carregada com níquel.

A fração solúvel coletada após a sonicação foi injetada na coluna de volume de 5 mL e pré-equilibrada com tampão A (50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 20 mM de Imidazol, 5% glicerol e 1 mM DTT). A eluição das proteínas foi feita através de um gradiente degrau até 100% de tampão B (50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 1M de Imidazol, 5% glicerol e 1 mM DTT). O eluato do gradiente foi fracionado em microtubos

de 1,5 mL e avaliado em gel de poliacrilamida através de eletroforese de proteínas em condições desnaturantes.

As frações coletadas foram purificadas e dialisadas com seu próprio tampão de lise sem imidazol. As concentrações das proteínas recombinantes purificadas foram determinadas medindo-se suas absorvâncias a 280 nm no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Eletroforese de proteína em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante foram realizadas conforme descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% (m/v) (para GlnD) ou de 14% (m/v) (para GlnK) e do gel de empilhamento foi de 4%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo orientação do fabricante (Bio-Rad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 M de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação. A voltagem da corrida foi a 180 V, utilizando o tampão descrito por Laemmli (25 mM de Tris-base, 192 mM de Glicina e 0,1% de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com o corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

Eletroforese de Proteínas em condições não desnaturantes (NATIVO)

As eletroforeses de proteínas em gel não desnaturante foram realizadas conforme protocolo descrito Forchhamer & Tandeau de Marczac (1994). O gel separador continha acrilamida 9% (reação acrilamida:bis-acrilamida 29:1), Tris-HCl 450 mmol/L pH 8,9, Nonidet P-40 0,025%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha 2,5% (solução estoque 10% de acrilamida e 2,5% de bis-acrilamida), Tris-H₃PO₄ 62,5 mmol/L pH 6,9, Nonidet P-40 0,031%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%.

O tampão de amostra não desnaturante foi preparado 5 vezes concentrado (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, EDTA 0,02 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,02%). As

corridas foram realizadas em gelo a 100 V por 4 horas em tampão de corrida para proteína nativa (Tris 5 mmol/L e glicina 38,4 mmol/L).

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

A uridililação das proteínas PII foi feita como descrito por Oliveira *et al*, 2015. O sistema de uridililação continha ATP (200 μ M), 2-OG (5 mM), UTP (5 mM), GlnK (300 μ M) e GlnD (10 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, mantidas em estufa overnight a 37°C e paradas por aquecimento a 70°C por 10 minutos. Posteriormente a reação foi extensivamente dialisada contra um tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM NaCl.

Ensaio de uridililação e desuridililação de GlnK

As reações de uridililação e desuridililação foram feitas com GlnK/GlnK-UMP₃ (30 μ M) em tampão de reação (100 mM Tris-Cl pH 7; 100 mM KCl e 25 mM de MgCl₂ ou MnCl₂ respectivamente). As reações de uridililação continham ainda UTP 1 mM. Nucleotídeos (ATP ou ADP), glutamina e 2-OG foram adicionados dependendo da condição testada no experimento. As reações foram pré-incubadas por 10 minutos a 37°C e disparadas com GlnD (1 μ M). As reações foram interrompidas com 3,3 volumes de tampão de amostra nativo (Tris-HCl pH 6,8 (250 mM), EDTA (20 mM), glicerol (50%) e azul de bromofenol (0,02%)). Para a verificação do estado de uridililação ou desuridililação da proteína GlnK, as reações foram aplicadas em gel de eletroforese nativo corados com corante Coomassie Blue.

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

Modelagem de GlnD

A sequência de aminoácidos da enzima GlnD selvagem de *H. seropedicae* (UniproID.: D8IU13) foi obtida no banco de dados Uniprot (UniProt, 2021). A estrutura tridimensional desta enzima foi modelada pelo servidor AlphaFold2 (Jumper *et al*, 2021;

Mirdita *et al*, 2022). Foram gerados 5 modelos, onde o melhor foi escolhido pela análise estereoquímica através do gráfico de Ramachandran (saves.mbi.ucla.edu). A busca das possíveis cavidades na estrutura foi executada através do programa Discovery Studio Visualizer (3ds.com). A simulação de interação entre as moléculas 2- OG e L-glutamina com GlnD foi realizada pelo método de *docking* molecular. O programa utilizado foi o AutoDock Vina (Trott and Olson, 2010) implementado na interface gráfica Pyrx-0.9 (Dallakyan and Olson, 2015). Os parâmetros usados foram os algoritmos de busca e ranqueamento padrões, centro de busca em 40, -10, -14, tamanho da caixa 25, 25, 25 em x, y e z, respectivamente. Foram restringidos os ângulos de torção da enzima, mas permitiu-se a flexibilidade das moléculas testadas. O *score* final obtido foi calculado como a média de quatro simulações para cada molécula. Todas as figuras foram geradas pelo programa Chimera (Pettersen *et al*, 2004).

RESULTADOS

Construção e clonagem dos genes contendo as mutações pontuais

Os genes contendo as mutações pontuais propostas foram produzidos através de reações de PCR. O resultado das amplificações está mostrado na figura 1 do material suplementar.

As ligações foram transformadas na estirpe TOP10 de *E. coli* e as colônias inoculadas em meio líquido. Os DNAs dos clones foram extraídos e analisados por restrição com as enzimas *XbaI/BamHI*. Após a reação de restrição, foram confirmados os mutantes GlnD A713D, GlnD V766D, GlnD G817D, GlnD D822G e GlnD F284D (Figura 2).

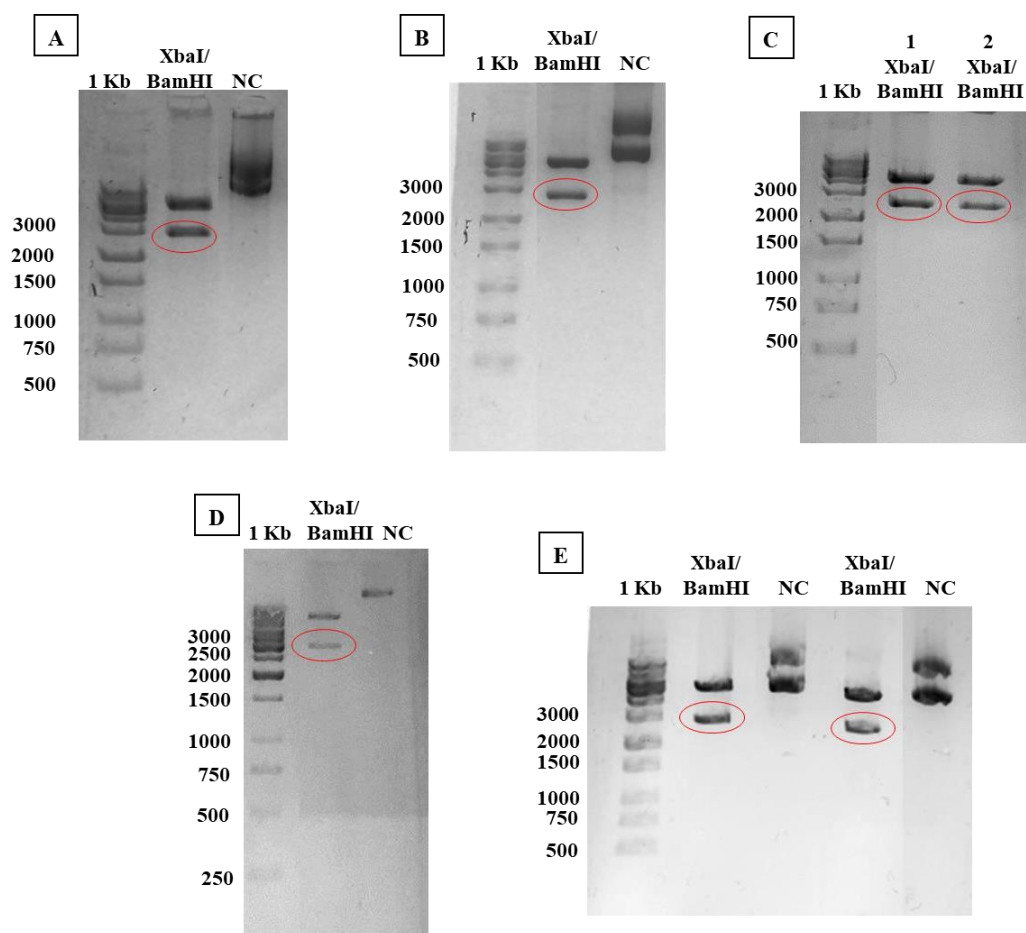


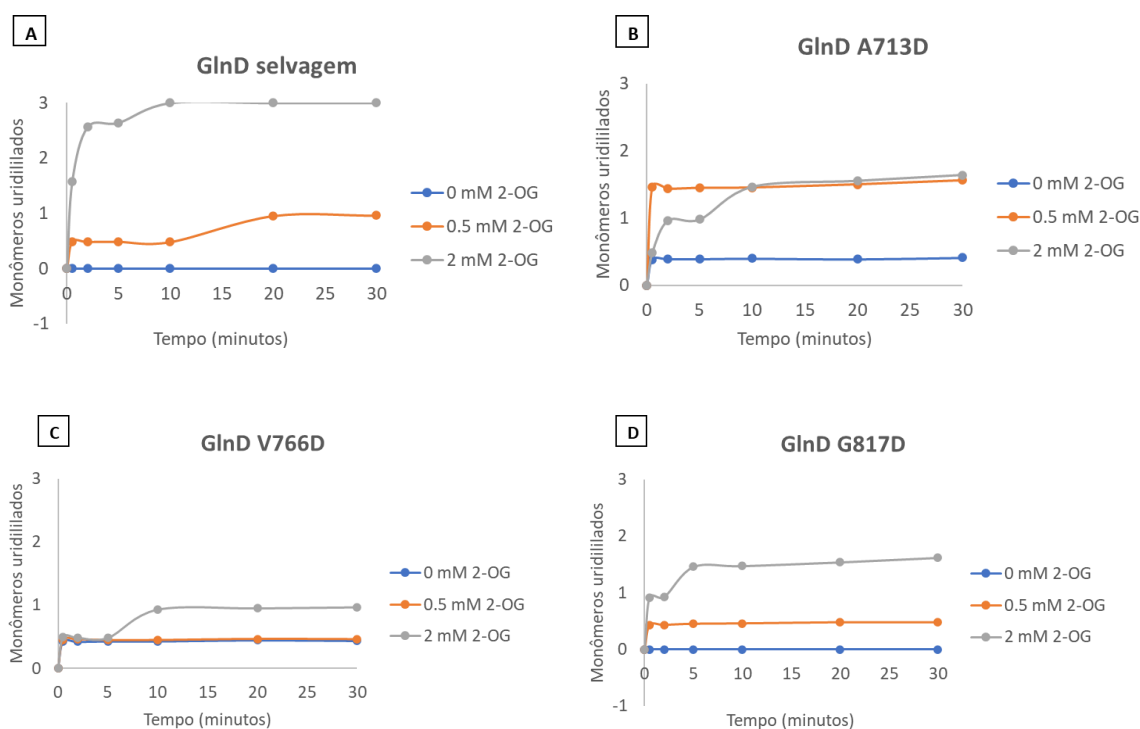
Figura 2. Confirmação dos clones dos mutantes pontuais através de restrição com as enzimas *XbaI/BamHI*. A. GlnD A713D, B. GlnD V766D, C. GlnD G817D, D. GlnD D822G, E. GlnD F284D. As reações de restrição foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira banda contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Sinapse), com os respectivos tamanhos em número de pares de base indicados. Os clones de cada mutante estão circulado em vermelho. (NC): Clone não cortado com as enzimas de restrição.

Purificação das proteínas

Após a confirmação das clonagens, os plasmídeos foram transformados na estirpe BL21 de *E. coli* para análise da expressão das proteínas mutantes e as variantes foram obtidas a partir de sua superexpressão induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG. Todas as induções ocorreram *overnight* a 18°C. As purificações foram realizadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, e a análise dos géis SDS-PAGE das purificações indica que todas as proteínas foram superexpressas e purificadas (Resultados não mostrados).

Regulação da atividade UTase da proteína GlnD e das proteínas com mutações pontuais de *H. seropedicae* por glutamina e 2-OG

A uridililação das proteínas PII por GlnD de *H. seropedicae* requer ATP e 2-OG, e é inibida por glutamina (Bonatto *et al*, 2007). As proteínas PII purificadas apresentam apenas uma banda no gel nativo, que corresponde à forma não modificada, e quando são uridililadas, quanto maior for o número de monômeros uridililados mais rápida é a migração destas proteínas no gel. Desta forma, quatro bandas podem ser visualizadas: PII, PII-(UMP)₁, PII-(UMP)₂ e PII-(UMP)₃. Nos nossos experimentos, realizamos curvas de tempo em diferentes concentrações de 2-OG (Figura 3). Confirmando resultados já demonstrados, o 2-OG estimulou atividade UTase de GlnD selvagem de *H. seropedicae* (3A). A atividade UTase catalisada pelas variantes mutantes V766D (3C), G817D (3D), D822G (3E) e F824D (3F) também tiveram o mesmo padrão de resposta que a GlnD selvagem, embora as variantes V766D (3C), G817D (3D) terem a sua atividade UTase afetada pela mutação. O mutante A713D, por sua vez, não foi sensível às variações na concentração do metabólito 2-OG (3B).



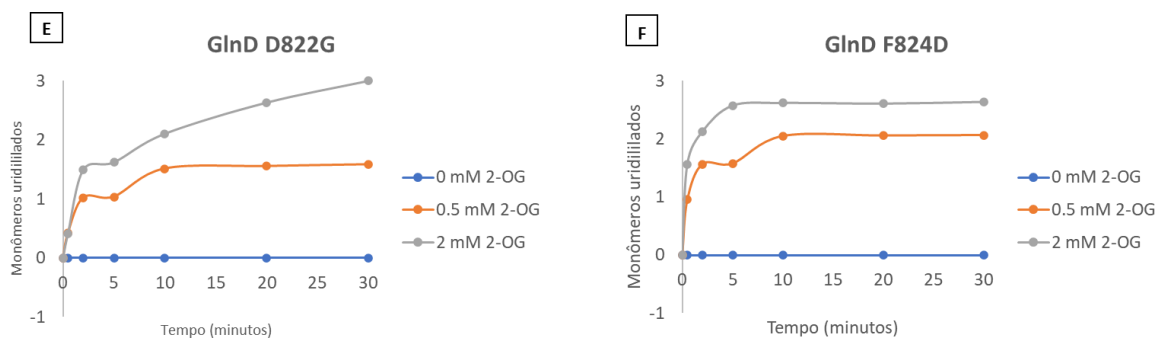
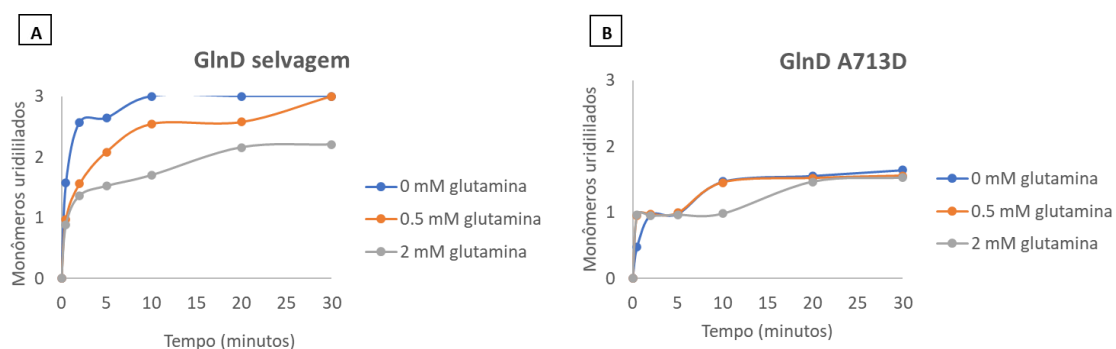


Figura 3. Efeito do 2-OG na uridilação de GlnK. As reações continham 30 μ M de GlnK, 0,5 mM de ATP, 1 mM UTP, 2-OG nas concentrações indicadas, e foram disparadas com 1 μ M de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridilados.

Além disso, também realizamos experimentos com a concentração de 2-OG mantida fixa em 2 mM e curvas de tempo em diferentes concentrações de glutamina. Confirmando resultados já demonstrados, a glutamina inibiu a atividade UTase de GlnD selvagem de *H. seropedicae* (Figura 4A). A atividade UTase catalisada pelas variantes mutantes V766D (4C), G817D (4D), D822G (4E) e F824D (4F) também tiveram o mesmo padrão de resposta que a GlnD selvagem, embora V766D e G817D tenham apresentado atividade menor. O mutante A713D, por sua vez, não teve a atividade UTase inibida por glutamina, resultado que corrobora com a hipótese da insensibilidade à glutamina dessa variante mutante.



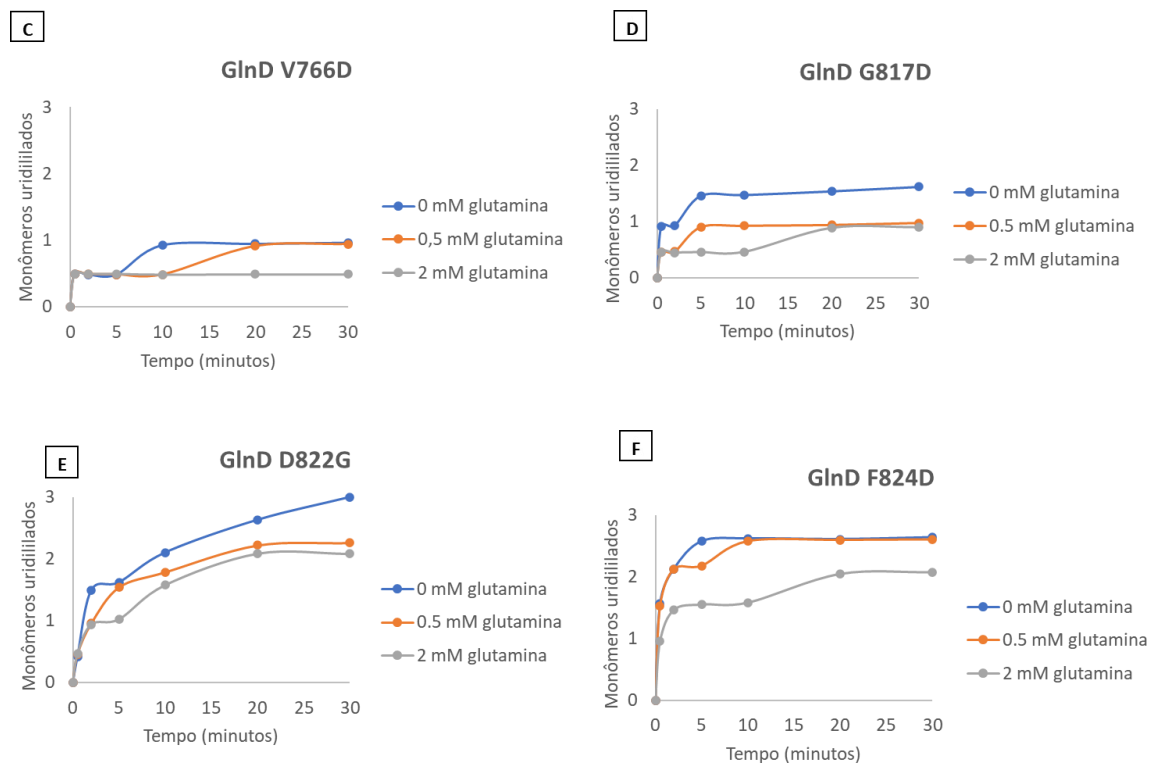


Figura 4. Efeito da glutamina na uridilação de GlnK. As reações continham 30 μ M de GlnK, 0,5 mM de ATP, 1 mM UTP, 2 mM de 2-OG, glutamina nas concentrações indicadas, e foram disparadas com 1 μ M de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

Regulação da atividade UR das variantes da proteína GlnD por glutamina e 2-OG

Para comparar o efeito de 2-OG na desuridilação de GlnK-UMP₃ por GlnD de *H. seropedicae* selvagem com as variantes mutantes, cinéticas da atividade UR de todas as enzimas foram testadas na presença de 2 mM de glutamina e em diferentes concentrações de 2-OG (Figura 5). Nas variantes contendo as mutações V766D (5C) G817D (5D), D822G (5E) e F824D (5F), pode-se observar que 2-OG inibe a atividade UR de maneira concentração-dependente, resultado semelhante ao encontrado para a GlnD selvagem. No entanto, um fenótipo diferente foi encontrado em GlnD A713D, no qual aparentemente 2-OG estimulou a atividade UR (Figura 5B).

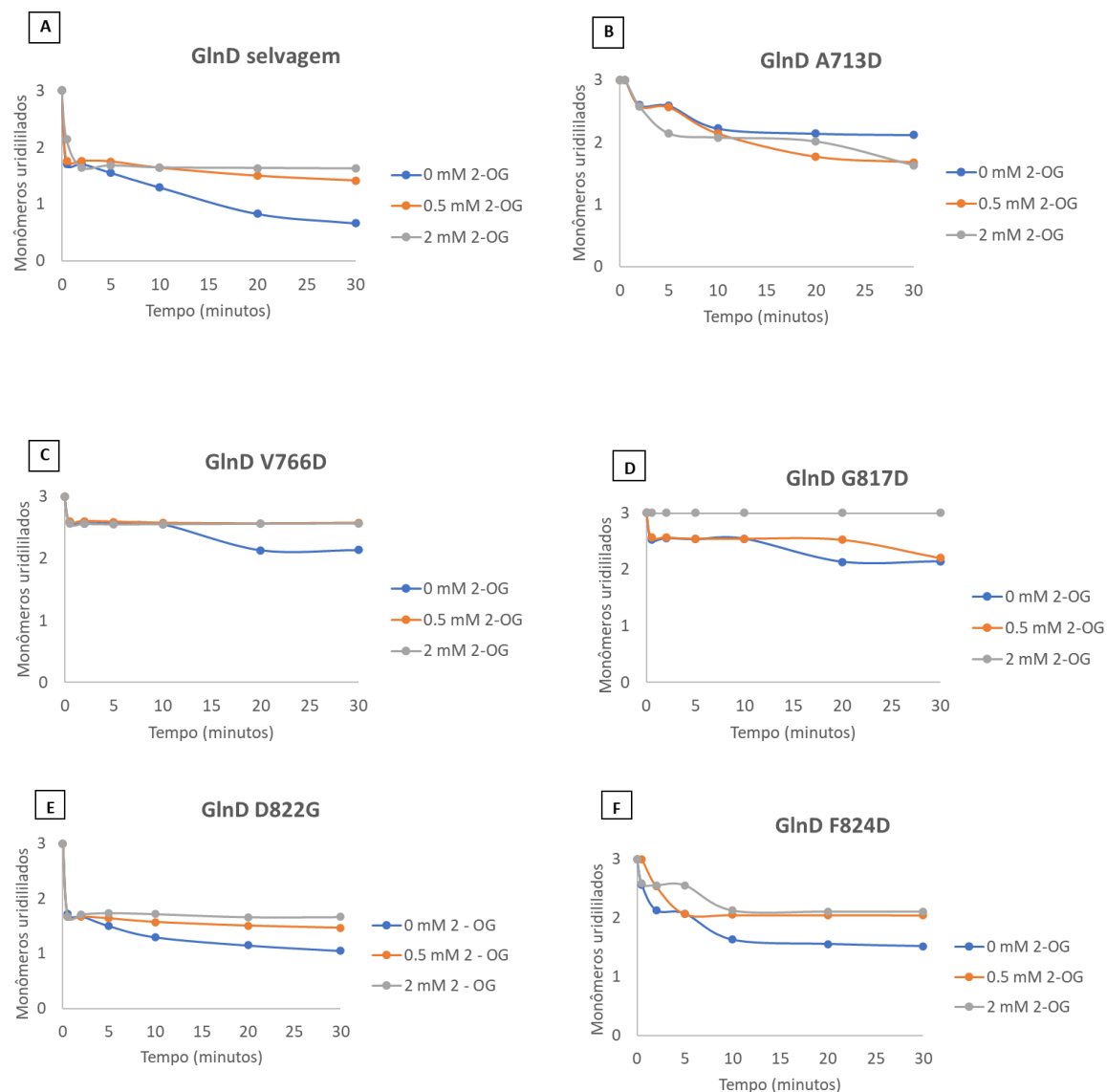


Figura 5. Efeito do 2-OG na desuridilação de GlnK-UMP₃. As reações continham 30 μ M de GlnK-UMP₃, 1 mM de ATP, 2 mM de glutamina, 2-OG nas concentrações indicadas e foram disparadas com 1 μ M de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

Para explorar o efeito da glutamina na atividade UR, cinéticas de desuridilação de GlnK-UMP₃ foram testadas mantendo-se a concentração de 2-OG fixa em 2 mM, que é suficiente para inibir totalmente a atividade UR da GlnD selvagem, e variando as concentrações de glutamina (Figura 6). É possível observar que o efeito inibitório do 2-OG foi parcialmente revertido quando a concentração de glutamina usada foi de 5 mM, e

quase inexistente com uma concentração de glutamina de 10 mM nas proteínas GlnD selvagem (6A) e nas variantes D822G (6E) e F824D (6F). Os mutantes A713D (6B), V766D (6C) e G817D (6D) por outro lado, não apresentaram diferença na atividade UR com a quantidade significativamente maior de glutamina, indicando que esses resíduos de aminoácidos podem estar relacionados com a sensibilidade à glutamina.

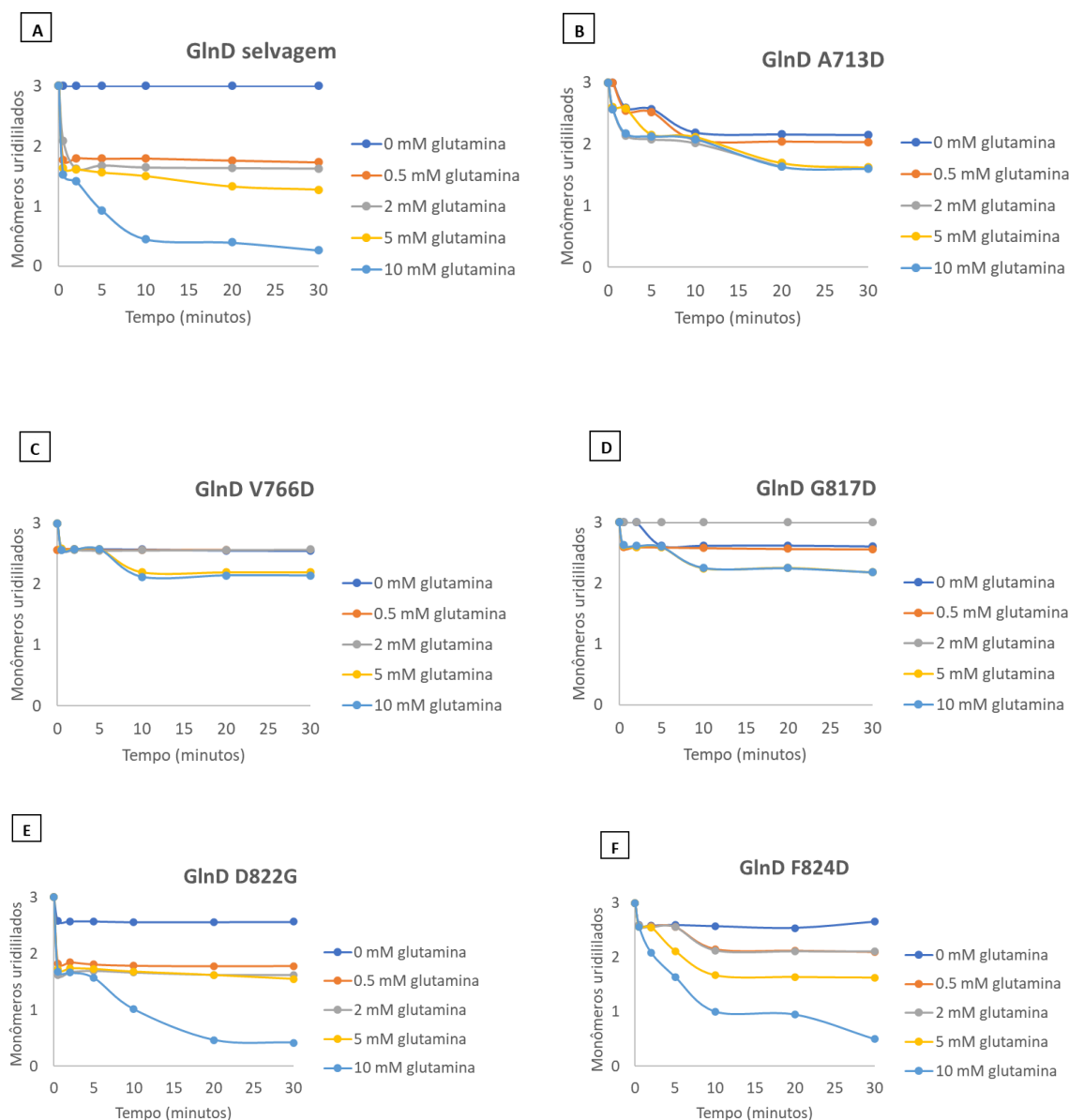


Figura 6. Efeito da glutamina na desuridilação de GlnK-UMP₃. As reações continham 30 μ M de GlnK-UMP₃, 1 mM de ATP, 2 mM de 2-OG, glutamina nas concentrações indicadas e foram disparadas com 1 μ M de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridilados.

Ao explorarmos mais essa perda de inibição por 2-OG na atividade UR catalisada por GlnD A713D, também observamos a perda de inibição por glutamina na atividade UTase (Figura 7). Em ambos os casos, aumentamos para 5 mM a concentração de 2-OG na desuridililação (7A) ou 5 mM de glutamina na uridililação (7B).

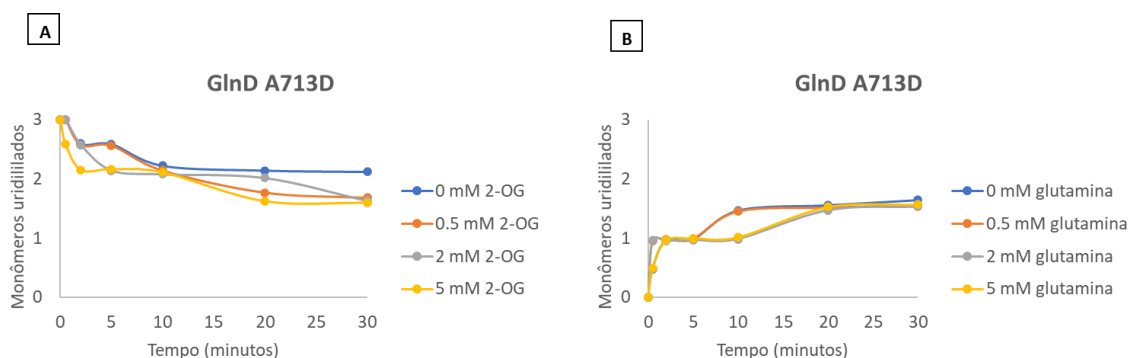


Figura 7. Ensaio de desuridililação (A) e uridililação (B) catalisados por GlnD A713D. As reações continham 30 μ M de GlnK-UMP₃, 2mM de glutamina, 1 mM de ATP, 2-OG nas concentrações indicadas e foram disparadas com 1 μ M de GlnD A713D. **(B)** As reações continham 30 μ M de GlnK, 2mM de 2-OG, 0,5 mM de ATP, glutamina nas concentrações indicadas e foram disparadas com 1 μ M de GlnD A713D. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C.

Dependência dos nucleotídeos de adenina na regulação da atividade UTase

Para se observar a dependência de nucleotídeos de adenina da atividade UTase das variantes de GlnD desse trabalho, nós testamos essa atividade na presença de ATP, ADP ou de nenhum nucleotídeo de adenina. Assim como mostrado por Bonatto e colaboradores (2012), o ATP e ADP foram igualmente eficazes na ativação da atividade UTase de GlnD sobre GlnK (Figura 8B e 8C). O mesmo perfil foi encontrado para as variantes mutantes, embora, nas variantes A713D e G817D essa atividade tenha sido menor. Por outro lado, quando nenhum nucleotídeo de adenina foi utilizado, a atividade UTase em todos os casos foi quase inexistente (Figura 8A). Curiosamente, a variante V766D manteve o mesmo padrão de resposta nos três casos analisados.

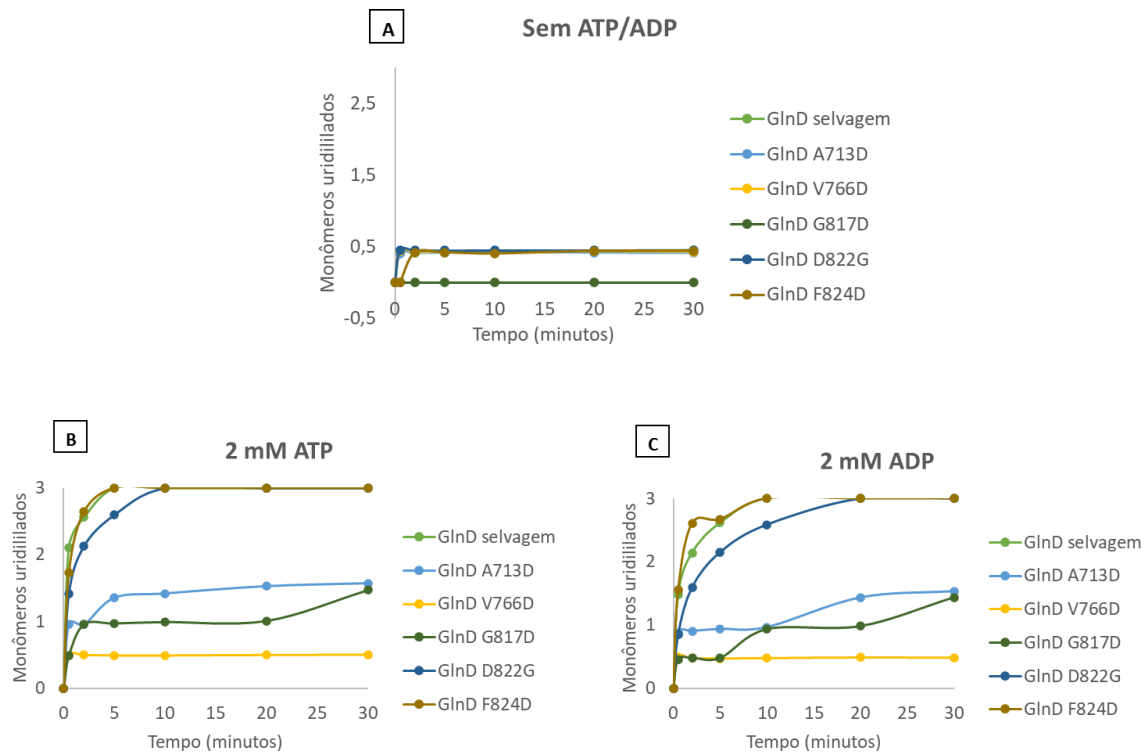


Figura 8. Efeito de ATP e ADP na uridilação de GlnK. As reações continham 30 μ M de GlnK, 1 mM UTP, 2 mM de 2-OG e foram disparadas com 1 μ M de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridilados.

Dependência dos nucleotídeos de adenina na regulação da atividade UR

Assim como no experimento da figura 8, os efeitos de ATP e ADP foram observados na atividade UR da proteína GlnD de *H. seropedicae* (Figura 9). A variante V766D e G817D apresentaram pouca atividade UR em todos os casos, enquanto as demais, assim como GlnD selvagem, apresentaram atividade UR um pouco maior com ATP do que com ADP (9B e 9C). Curiosamente, a variante D822G apresentou atividade UR máxima sem nenhum nucleotídeo de adenina (9A).

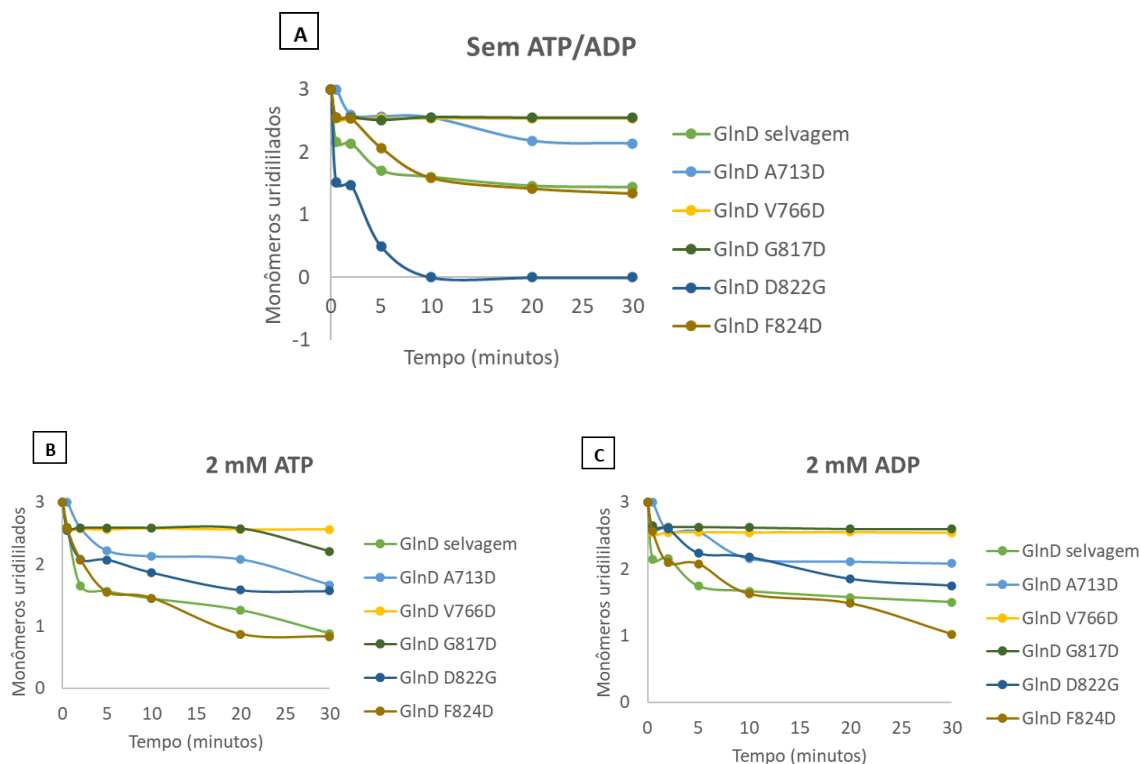


Figura 9. Efeito de ATP e ADP na desuridilação de GlnK-UMP₃. As reações continham 30 μM de GlnK-UMP₃, 2 mM de glutamina e foram disparadas com 1 μM de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μL foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

A fim de confirmar a alta atividade UR da variante D822G na ausência de nucleotídeos, cinéticas com curvas de ATP foram realizadas, e o resultado foi comparado com reações UR catalisadas pela GlnD selvagem (Figura 10). O resultado confirma que o mutante GlnD D822G não requer nucleotídeo para desuridilação, visto que a quantidade de 2 mM de ATP se assemelha ao padrão da curva de GlnD sem nenhum nucleotídeo. Isto é inesperado, pois ao fazer mutações pontuais nós buscamos tirar uma regulação e neste caso, GlnD D822G parece ter adicionado um mecanismo regulatório por nucleotídeos. Ao compararmos os gráficos, GlnD selvagem sem nucleotídeo consegue diminuir a atividade UR, e com o mutante D822G essa capacidade foi perdida.

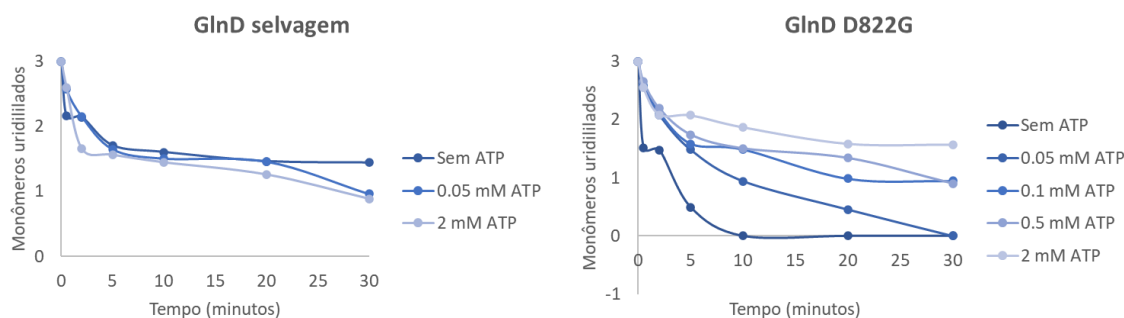


Figura 10. Efeito de ATP na desuridilação de GlnK-UMP₃ catalisada por GlnD e GlnD D822G. As reações continham 25 μ M de GlnK-UMP₃, 2 mM de glutamina e foram disparadas com 1 μ M de cada enzima. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridilados.

Modelagem de GlnD

A estrutura tridimensional da enzima GlnD inteira ainda não foi determinada experimentalmente. Para entender melhor os dados funcionais encontrados, foi necessário obter um modelo *in silico*. A estrutura foi gerada com todos os seus domínios e está representada na Figura 11. De acordo com o gráfico de Ramachandran, 99,9% dos resíduos do melhor modelo estão em regiões permitidas, indicando que a os ângulos de torção ϕ (phi) e ψ (psi) assumiram posições estáveis.

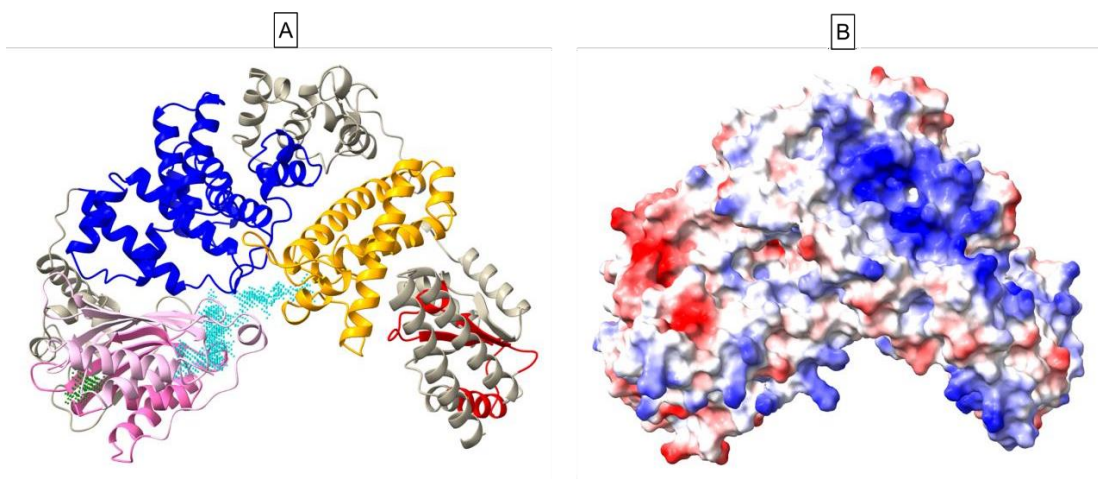


Figura 11. Estrutura tridimensional da enzima GlnD de *H. seropedicae*. A) Representação em Ribbons com diferentes cores representando os domínios segundo a previsão realizada pelo servidor InterPro: ACT (rosa), HD (azul), Transferase (amarelo), NT (vermelho). Em verde escuro e ciano são cavidades próximo ao domínio ACT. B) Representação da superfície eletrostática: cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul).

A partir do modelo tridimensional da enzima GlnD obtido, investigamos possíveis correlações estruturais que expliquem os fenótipos encontrados nas variantes A713D e D822G. Para isso, foram rastreadas cavidades na superfície e no interior da estrutura que possuem características para a ligação de um ligante. Nas Figuras 11A e 12 são representadas com cores diferentes as principais cavidades em torno do domínio ACT que estão próximas as mutações. A Figura 12 ilustra com mais detalhes o domínio ACT. Percebe-se que sua estrutura possui simetria, possibilitando dividir este domínio em duas subestruturas, representadas por tons de cores rosa diferentes. Entre as subestruturas existem duas cavidades em lados opostos, representadas pelas cores verde-escuro e ciano. Na primeira cavidade está presente a mutação A713D. Analisando os resíduos em torno onde é gerada a mutação, verifica-se a presença de dois aspartatos (D681 e D715), separados diretamente pelo resíduo que sofre a mutação. A substituição por mais um aspartato pode causar um confronto estérico entre os resíduos, possivelmente forçando uma mudança neste local. Os ensaios com glutamina e 2-OG das Figuras 5, 6 e 7 para esta variante A713D demonstram uma alteração nas atividades UR e UTase. Assim, estas observações sugerem que a cavidade pode ser um possível sítio de ligação para estas duas moléculas.

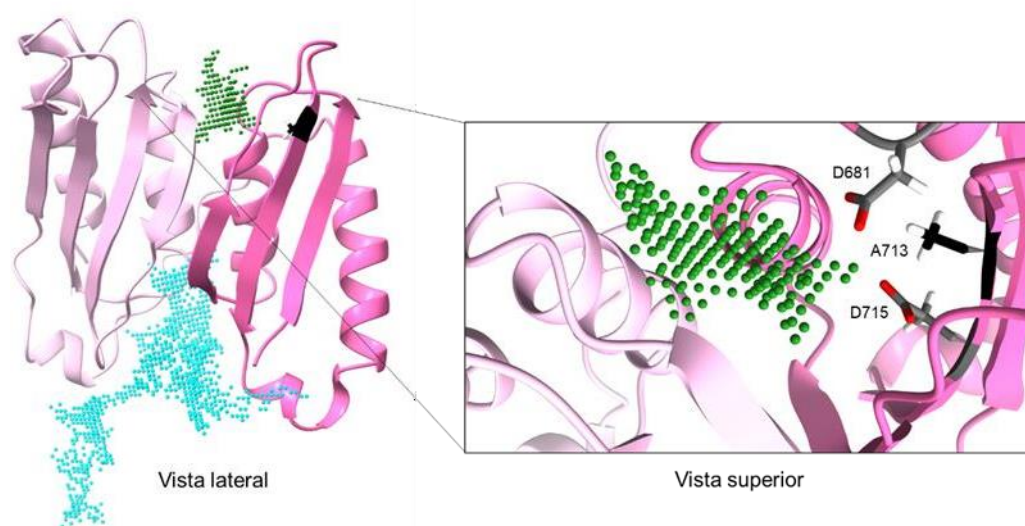


Figura 12. Domínio ACT, com as cavidades próximas às mutações representadas pelas cores verde-escuro (A713D) e ciano (D822G).

Para avaliar a afinidade da cavidade encontrada em GlnD selvagem com glutamina e 2-OG, foram realizadas simulações de *docking molecular* pelo programa Autodock Vina (Figura 13). Os resultados demonstram que as duas moléculas possuem

capacidade de se ligar ao local indicado, com *score* igual a $-5,4 \pm 0,0$ e $5,1 \pm 0,0$, respectivamente. Esta simulação pode não representar a realidade, pois não sabemos a conformação correta que a proteína se encontra. Além disso, a ligação no mesmo sítio de ligação e envolvendo as mesmas interações não seria possível, pois os efeitos destas moléculas nas atividades UR e UTase são opostas. No entanto, é válido considerar que glutamina e 2-OG compartilham esta cavidade por possuírem uma semelhança estrutural em seus esqueletos carbônicos, diferindo na quantidade de cargas (0 e -2), átomos doadores (2 e nenhum) e aceptores de ligação de hidrogênio (3 e 5), respectivamente. Em última análise, estas diferenças podem promover os efeitos opostos.

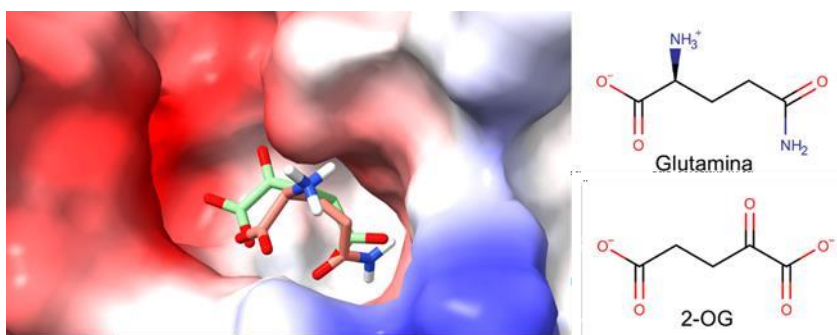


Figura 13. Simulações de *docking molecular* das moléculas glutamina e 2-OG na enzima GlnD selvagem de *H. seropedicae*.

No lado oposto da cavidade analisada anteriormente, existe outra que é compartilhada entre os domínios ACT e HD (representada pela cor ciano), onde próximo a ela está o resíduo mutado D822G (Figura 14A). Além deste resíduo, todos os outros resíduos conservados em ACT-C (G817, T815, A811, D789, L794, G792, F824) também estão próximos a esta cavidade (Figura 14B). Os dados das Figuras 9 e 10 demonstram que esta variante tem a atividade UR estimulada na ausência de ATP (ou ADP). No entanto, isso não ocorre na GlnD selvagem. Possivelmente a cavidade indicada é um local de ligação de ATP e sua presença faz com que ACT regule a atividade UR. Porém quem propicia a ligação de ATP é 2-OG, ou vice-versa.

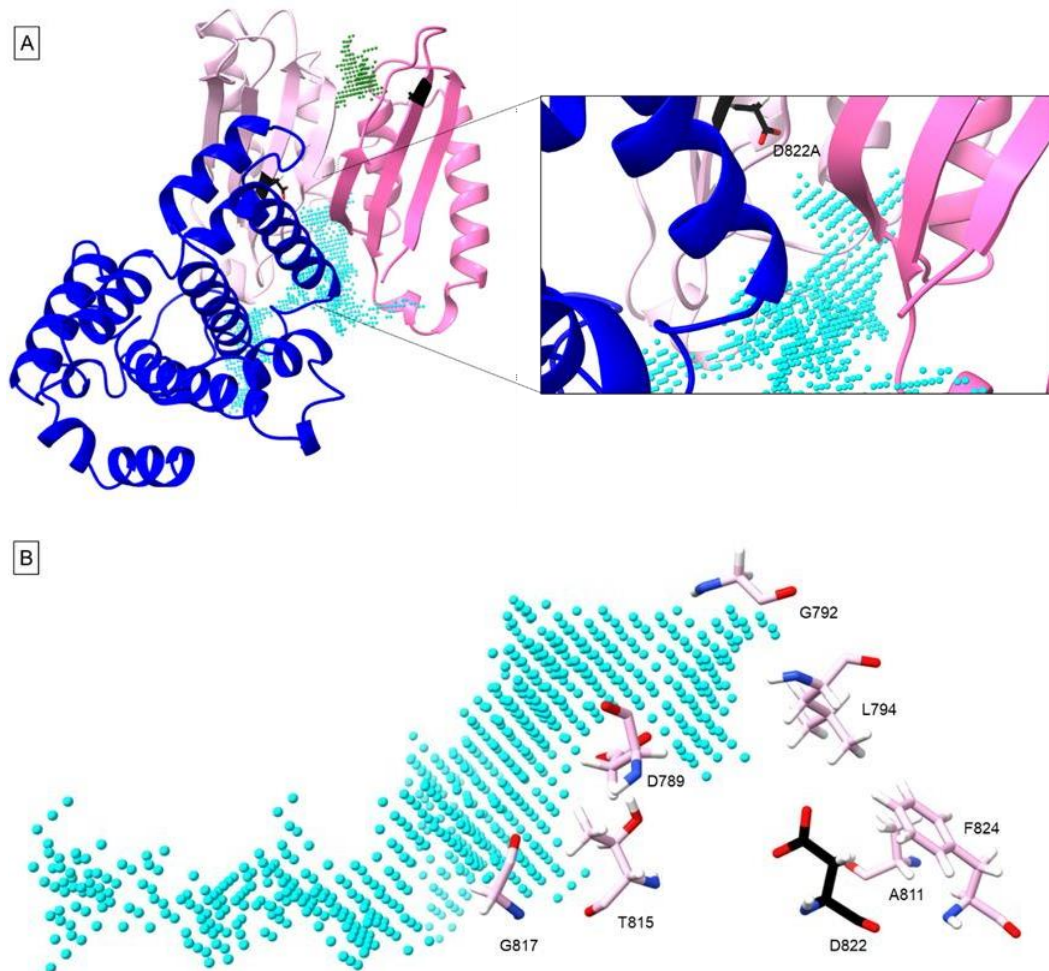


Figura 14. Possível cavidade de ligação para ATP (ou ADP). A) Resíduos conservados em ACT-C. Em preto o resíduo mutado D822G e em ciano a cavidade compartilhada entre ACT e HD. B) Domínio ACT (rosa) e HD (azul).

DISCUSSÃO

As proteínas PII constituem uma das famílias de proteínas de transdução de sinal mais amplamente distribuídas, responsáveis por integrar os sinais de nitrogênio celular, carbono e energia, e então regular a atividade de proteínas alvo por interação proteína-proteína. Desse modo, essas proteínas desempenham um papel importante na coordenação da regulação dos processos metabólicos centrais (Forchhammer *et al*, 2008). Uma característica das proteínas PII é sua capacidade de ser alternada entre duas formas por modificação covalente no resíduo de Tyr51 no *loop*-T (Arcondéguy *et al*, 2001). Em muitas bactérias, essa modificação é catalisada pela enzima bifuncional GlnD em resposta aos níveis de nitrogênio. Em *E. coli*, acredita-se que GlnD seja o sensor de suficiência de

nitrogênio pela detecção dos níveis de glutamina, enquanto PII é o sensor de deficiência de nitrogênio, detectando aumentos dos níveis de 2-OG (Williams *et al*, 2013).

A síntese de glutamina em bactérias ocorre através da enzima glutamina sintetase (GS), que produz glutamina a partir de amônio e glutamato. Por isso a glutamina se constitui em um regulador intracelular que reflete a disponibilidade de amônio. Porém, além da glutamina, o 2-OG também parece ter um papel importante na sinalização de nitrogênio (Huergo e Dixon, 2015). Como o 2-OG atua como o esqueleto de carbono para as reações de assimilação de nitrogênio pela via GS-GOGAT, o nível desse metabólito é esperado por flutuar de acordo com a disponibilidade de amônio de forma inversamente proporcional à da glutamina. De fato, a concentração de 2-OG aumenta com limitação de amônia (Schumacher *et al*, 2013). Como GlnD possui sítio de ligação à glutamina, a ligação desse metabólito estimula a atividade da UR e, na sua ausência, a atividade UTase predomina (Huergo *et al*, 2012).

A regulação recíproca das atividades UR e UTase de GlnD pela razão glutamina:2-OG é exercida pelos domínios ACT. Em *H. seropedicae* e *E. coli*, a deleção dos domínios ACT resulta em uma GlnD que possui atividades UTase e UR constitutivas, catalisando um ciclo fútil de uridililação/desuridililação (Emori *et al*, 2018; Zhang *et al*, 2010). Para fazer essa integração de sinais e exercer a regulação recíproca sobre os domínios catalíticos de GlnD, o domínio ACT deve ser capaz de interagir com diversos metabólitos, permitindo a sensibilidade às condições ambientais da célula em um dado momento. No entanto, os detalhes moleculares dessa regulação não são conhecidos até o momento.

Trabalhos anteriores com GlnD de *H. seropedicae* demonstraram que a atividade UTase é fortemente estimulada por 2-OG, enquanto a atividade UR é fortemente inibida por esse efector (Bonatto *et al*, 2007; Emori *et al*, 2018). Em *E. coli* (Jiang *et al*, 1998), *R. rubrum* (Jonsson & Nordlund, 2007) e *H. seropedicae* (Emori *et al*, 2018), a atividade UR de GlnD é estimulada por glutamina. Em *E. coli*, além de glutamina, o 2-OG também estimula a desuridililação das proteínas PII (Jiang *et al*, 1998). Em *R. rubrum* por outro lado, a glutamina parece estimular a desuridililação, independentemente da presença ou ausência de 2-OG (Jonsson & Nordlund, 2007).

Neste trabalho, as proteínas GlnK, GlnD selvagem e mutantes de *H. seropedicae* foram purificadas, e a capacidade de GlnK ser modificada por GlnD selvagem e pelas

proteínas mutantes foi avaliada. Com relação a atividade UTase, confirmando resultados já demonstrados, esta foi fortemente estimulada por 2-OG (Figura 3) e inibida por glutamina (Figura 4). Com relação a atividade UR, as variantes mutantes V766D, G817D, D822G e F824D, foram inibidas por 2-OG da mesma forma que a GlnD selvagem (Figura 5). A exceção foi a proteína mutante A713D, que parece ter perdido essa inibição (Figura 5B). Embora não exista até o momento nenhuma evidência direta da ligação de 2-OG pelo domínio ACT de GlnD, resultados previamente publicados com a GlnD de *H. seropedicae* sugerem que 2-OG e glutamina podem competir pelo mesmo sítio de ligação no domínio ACT da GlnD (Emori *et al*, 2018). Esse fato indica que a sensibilidade a esse efetor parece estar localizada em sítios diferentes para a regulação UTase e UR. Possivelmente, a regulação da atividade UTase de GlnD de *H. seropedicae* dependa da ligação de 2-OG em PII, regulando a estrutura tridimensional do substrato de GlnD ao expor resíduos de aminoácidos essenciais para interação do domínio nucleotidil-transferase de GlnD com o *loop*-T de PII. Para a regulação da atividade UR, por sua vez, o 2-OG possivelmente compete com glutamina pela ligação no domínio ACT, dessa forma reprimindo a atividade UR. Nesse modelo, o resíduo de aminoácido A713 poderia participar da ligação de 2-OG, e a sua substituição por um resíduo de aspartato levaria a uma impossibilidade dessa ligação.

Com relação à regulação de GlnD por glutamina, um trabalho anterior com GlnD de *H. seropedicae* demonstrou que a atividade UR é estimulada por esse efetor, inclusive com nenhuma atividade observada na sua ausência (Emori *et al*, 2018). Aqui, usamos uma concentração de 2-OG suficiente para inibir a atividade UR e vimos que este efeito inibitório foi parcialmente revertido ao aumentarmos a concentração de glutamina, e quase inexistente com uma concentração de glutamina 5 vezes maior (10 mM) nas proteínas GlnD selvagem (Figura 6A) e nas variantes D822G (Figura 6E) e F824D (Figura 6F), indicando que esses resíduos de aminoácidos não são relacionados com a sensibilidade da atividade UR à glutamina. Nos mutantes GlnD A713D (Figura 6B), GlnD V766D (Figura 6C) e G817D (Figura 6D) por outro lado, quantidades significativamente maiores de glutamina não foram capazes de se contrapor à inibição causada pelo 2-OG. No caso da variante mutante A713D, esse resultado corrobora a hipótese de que esse resíduo de alanina possivelmente é essencial para a ligação da glutamina e do 2-OG.

Bonatto e colaboradores (2012) observaram que ADP e o ATP estimularam igualmente a uridililação de GlnK de *H. seropedicae*, enquanto GlnB apresentou uma menor taxa de uridililação na presença de ADP comparada a ATP. Além disso, estudos mostraram que tanto para GlnB de *E. coli* quanto para GlnJ de *R. rubrum* e GlnZ ou GlnB de *A. brasilense*, o ADP foi menos eficiente para estimular a uridililação do que o ATP (Jiang & Ninfa, 2007; Teixeira *et al.*, 2008; Gerhardt *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que o ATP e ADP foram igualmente eficazes na ativação da atividade UTase de GlnD selvagem sobre GlnK e o mesmo perfil foi encontrado para as variantes mutantes, embora nas variantes A713D e G817D essa atividade tenha sido menor (Figura 8B, 8C e 8D). Esses resultados mostram a importância dos nucleotídeos de adenina na uridililação, visto que na ausência deles, a uridililação é muito baixa ou não ocorre (Figura 9A). Com relação a atividade UR, a proteína selvagem e as demais variantes apresentaram um nível de desuridililação um pouco maior com ATP (Figura 9B) do que com ADP (Figura 9C), enquanto que na ausência de nucleotídeo, D822G apresentou atividade UR máxima (Figura 9A). Como consequência das atividades apresentadas pela variante D822G, podemos inferir que a regulação por nucleotídeos de adenina é diferente na uridililação e desuridililação, visto que este mutante mostrou ser bastante regulado na atividade UTase (Figura 8A) e perdeu essa regulação na atividade UR na ausência de nucleotídeo (Figura 9A). A importância do resíduo de aminoácido D822 ainda não é clara, mas é inegável sua importância na regulação dessas atividades. Esses dados também reforçam a hipótese de que os domínios ACT da proteína GlnD de *H. seropedicae* são capazes de ligar nucleotídeos de adenina para regular sua atividade. No entanto, é interessante notar que a atividade UTase desse mutante segue sendo regulada por ATP/ADP da mesma forma que o selvagem, mas a atividade UR teve um comportamento anômalo na ausência de nucleotídeos. Esse resultado pode indicar que o sítio de sensibilidade a nucleotídeos de adenina das atividades UR e UTase estão localizados em locais distintos, da mesma forma como discutido para o 2-OG anteriormente. Neste modelo, a uridililação parece depender da ligação de ATP ou ADP nas PII. Na atividade UR, por outro lado, o fenótipo do mutante D822G indica que o segundo ACT, o mais C-terminal dos domínios ACT, possui de alguma forma uma sensibilidade a nucleotídeos de adenina.

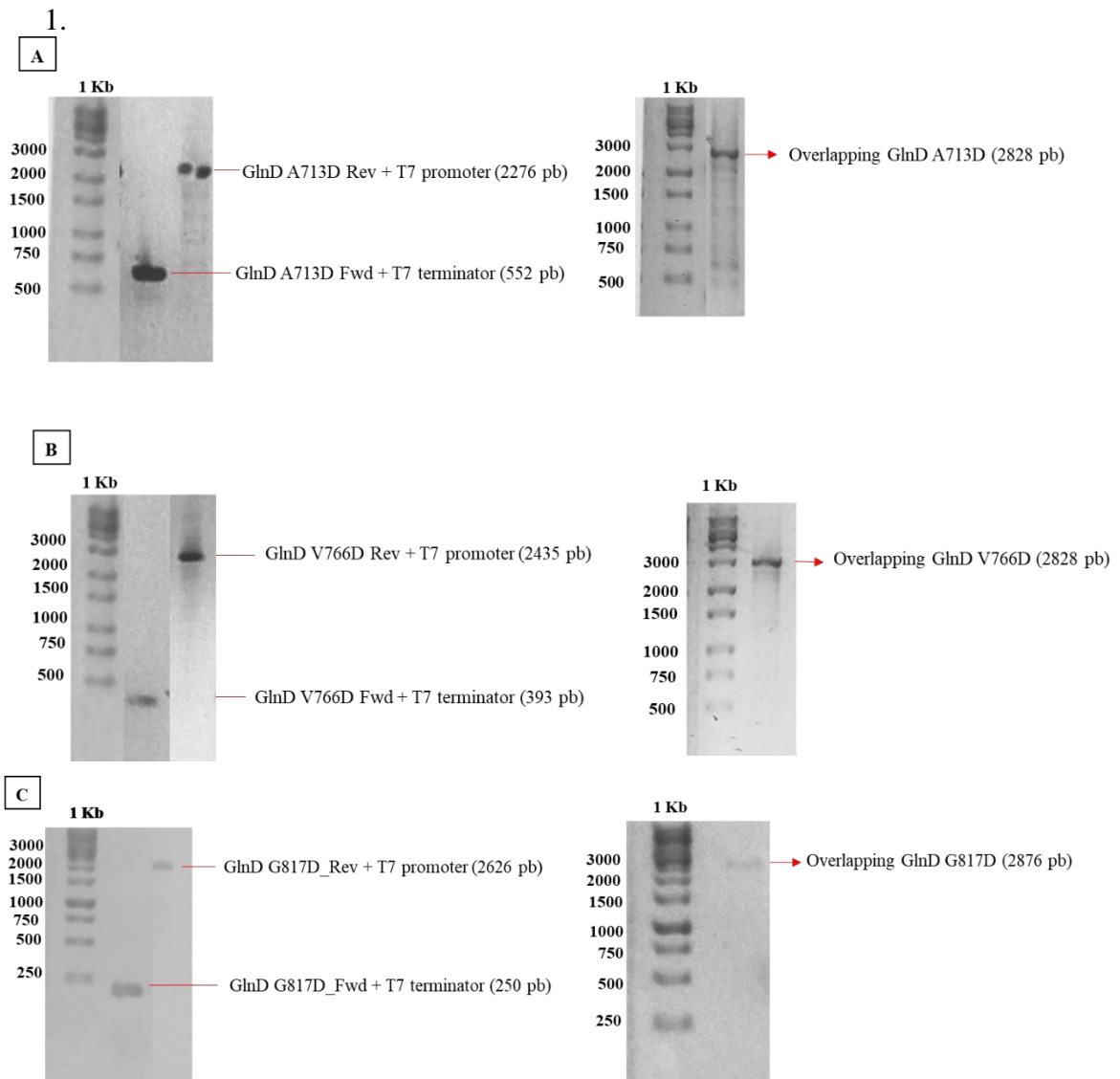
A partir dos resultados avaliados anteriormente com GlnD selvagem e variantes A713D e D822G podemos propor um modelo de regulação da atividade UR. Na enzima

selvagem, a atividade UR aumenta em função de glutamina. Ela se liga à cavidade proposta anteriormente no domínio ACT e gera uma modificação alostérica afetando o lado oposto deste domínio. Assim, o ACT inteiro ou parte dele se desliga dos outros domínios (a estrutura de GlnD se abre), possibilitando a atividade UR por HD. Esta atividade se mantém, sem alteração significativa, na presença ou ausência de ATP, o que sugere que o nucleotídeo não possui alta afinidade pela cavidade na presença ou ausência de glutamina. No entanto a mutação D822G possibilita uma maior afinidade do ATP pela cavidade, e sua presença estabiliza o domínio ACT com HD em uma forma fechada, inibindo a atividade UR, mesmo na presença de glutamina. Assim, na selvagem, possivelmente o ATP só exercerá um papel mais significativo na regulação da atividade UR quando 2-OG estiver presente. A ligação de 2-OG na mesma cavidade onde se liga glutamina, poderia causar uma mudança alostérica que permite ATP se ligar na cavidade proposta e estabilize o domínio ACT em uma forma fechada, inibindo a atividade UR.

Os dados de atividade UTase corroboram o modelo proposto, pois a combinação de ATP e 2-OG permitem a atividade UTase (Figuras 8A e 8B) e ao mesmo tempo mantém os domínios ACT e HD juntos, inibindo a atividade UR.

Sumarizando, no presente trabalho os resultados sugerem fortemente que o domínio ACT-N parece conter um sítio de ligação de efetores, o qual aparentemente é compartilhado entre glutamina e 2-OG, e possivelmente a razão 2-OG/glutamina regule as atividades UR e UTase. Se a razão for alta, existe a tendência que o domínio ACT de GlnD fique fechado pela ligação de 2-OG e ATP (ADP), ativando a atividade UTase e inibindo a UR. Se for baixa, o domínio ACT ou parte dele se abre, pela ligação de glutamina e a atividade UR é ativada. Estas observações impedem um ciclo fútil de UR e UTase.

MATERIAL SUPPLEMENTAR



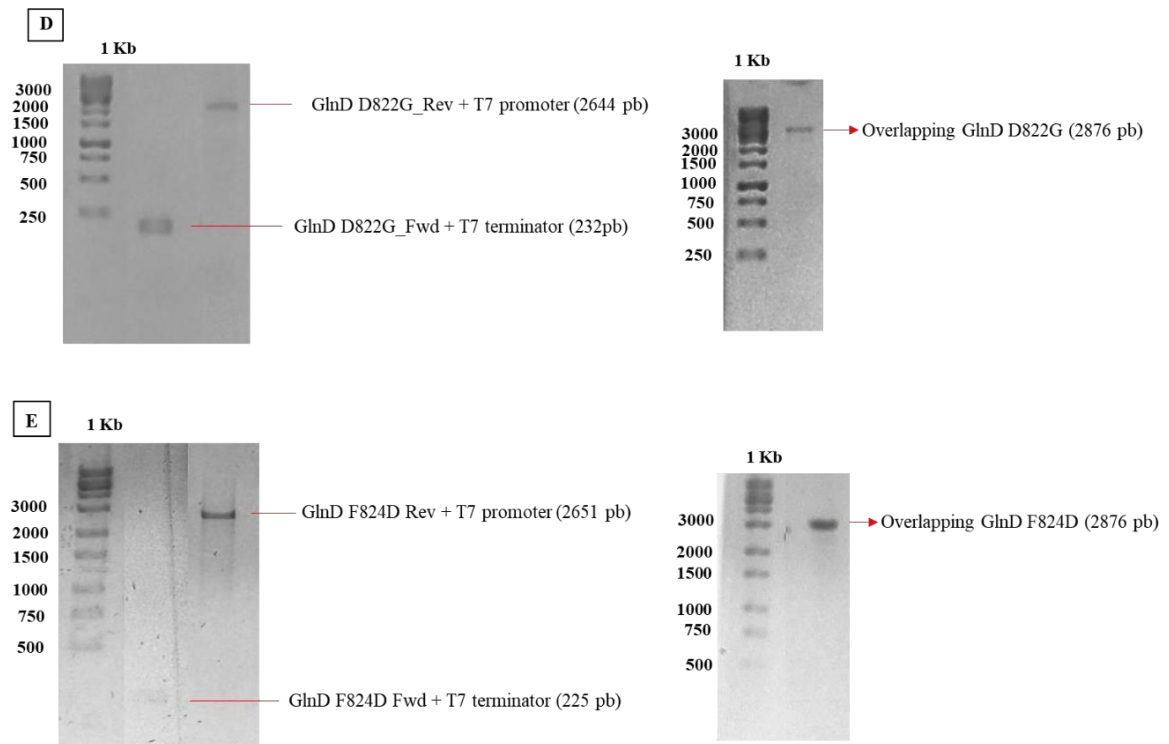


Figura 1. Eletroforese das mutações pontuais através de reações de PCR. A. GlnD A713D, B. GlnD V766D, C. GlnD G817D, D. GlnD D822G, E. GlnD F824D. As reações de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As bandas visualizadas em transluminador UV. A primeira banda contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Sinapse), 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.

ARTIGO 2. Regulação *in trans* da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae* pelo domínio ACT

ABSTRACT

PII are signal transduction proteins that integrate metabolic signals and transmit this information to a large number of protein targets through protein-protein interaction. The bifunctional enzyme GlnD covalently modifies PII proteins by uridylation (UTase activity) when fixed nitrogen is scarce and by deuridylation (UR activity) under nitrogen excess conditions. Here, we characterize the *in vitro* regulation of deuridylation activity of *H. seropedicae* GlnD protein by truncated versions of the regulatory GlnD domains. The GlnD Δ ACT protein, lacking the ACT regulatory domains, catalyzes the futile cycle of PII uridylation and deuridylation. To attempt restoring the proper regulation of GlnD Δ ACT, we expressed, purified and tested the regulatory capacity of truncated versions of the ACT domains. The truncated GlnD ACT1 domain was able to control the futile cycle, indicating that we successfully developed a tool to study the regulatory mechanism of enzyme activities of GlnD.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento fundamental para todos os seres vivos, sendo o nutriente mais importante para o crescimento celular após o carbono (Yurgel *et al*, 2012). Porém, por constituir 78% da atmosfera na forma de dinitrogênio (N₂), não é assimilável pela maioria dos organismos vivos. Apenas um pequeno grupo de procariontes, denominados diazotrofos, é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico ao amônio, em um processo chamado fixação biológica de nitrogênio (Chubatsu *et al*, 2012).

A fim de lidar com as variações na disponibilidade de carbono e nitrogênio, os microrganismos desenvolveram sistemas de transdução de sinais para detectar o estado nutricional predominante e assim, gerar a resposta metabólica apropriada (Huergo e Dixon, 2015). A regulação do metabolismo do nitrogênio em proteobactérias é exercida pelo sistema Ntr (Merrick e Edwards, 1995), no qual as proteínas PII exercem um papel fundamental ao controlar a atividade de proteínas alvo através de interação proteína-proteína (Reitzer, 2003). Ao agregar o status celular de nitrogênio e carbono (níveis de 2-

OG) com o *status* de energia (relação ATP / ADP), essas proteínas funcionam sinalizando os níveis intracelulares de metabólitos-chave (Arcondéguy *et al*, 2001).

Além da regulação através da ligação à efetores alostéricos, PII pode ser alternada entre duas formas por modificação covalente reversível de um resíduo no *loop-T* (Arcondéguy *et al*, 2001). Sob condições de limitação de nitrogênio, PII são modificadas por uridililação, e sob condições de excesso de nitrogênio, o grupamento UMP é removido. Ambas as reações (uridilil transferase (UTase) / uridilil removedora (UR)) são catalisadas pela enzima bifuncional GlnD (Bonatto *et al*, 2007). Essa enzima possui 4 domínios, dos quais o domínio N-terminal codifica a atividade UTase e o domínio HD adjacente codifica a atividade UR. Além destes, GlnD possui dois domínios ACT C-terminais, envolvidos na regulação da atividade de GlnD, através da ligação da glutamina (Zhang *et al*, 2010).

Herbaspirillum seropedicae possui dois genes que codificam proteínas PII: *glnB*, é monocistrônico e constitutivamente expresso e *glnK*, é co-transcrito com *amtB* (codifica o canal de amônio AmtB) (Noindorf *et al*, 2006). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, vibrióide, membro da classe β do filo proteobactérias, e por apresentar baixa taxa de sobrevivência nos solos é considerada um microrganismo endofítico, ou seja, capaz de colonizar tecidos de plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Baldani *et al*, 1986; Olivares *et al*, 1997).

Emori e colaboradores (2018) demonstraram que a proteína GlnD Δ ACT de *H. seropedicae* realiza um ciclo fútil de uridililação/desuridililação pela verificação da taxa de uridililação de GlnK por GlnD Δ ACT em diferentes concentrações de UTP. Quando todo o UTP é consumido, GlnD Δ ACT catalisa apenas a atividade UR da enzima. Assim, quanto maior a concentração de UTP usada, mais tempo GlnK permaneceu uridililada.

Em *H. seropedicae*, a atividade UR de GlnD é estimulada por glutamina e inibida por 2-OG (Emori *et al*, 2018), enquanto a atividade UTase é fortemente estimulada por 2-OG (Bonatto *et al*, 2007). Neste trabalho, exploramos a regulação *in trans* da proteína GlnD Δ ACT de *H. seropedicae* pelos domínios ACT e sua interação a efetores, bem como a importância do domínio ACT no controle recíproco das atividades UTase e UR para evitar o ciclo fútil de uridililação e desuridililação catalisado pela proteína GlnD Δ ACT.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias e plasmídeos

Tabela 1. Bactérias e plasmídeos

Estirpe ou plasmídeo	Fenótipo e/ou genótipo	Referência
Estirpes 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)	Sambrook <i>et al</i> , 1989
Top10	F' <i>mcrA Δ (mvr – hrd RMS – mcrBC) φ 80 lacZ ΔML5 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara – leu) 7697 galU galK rpsL (Sm^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plasmídeos		
pETNdeM-11	Vetor de expressão. Expressa a proteína de fusão com His-Tag/ promotor T7	Little <i>et al</i> , 2011
pEMB200	Km ^R , <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, pT7	Bonatto <i>et al</i> , 2007
pGH2	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, pT7	Bonatto <i>et al</i> , 2007
pGlnDΔACTpET	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com os domínios NT e HD	Emori <i>et al</i> , 2018
pGlnDACT1-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com o domínio ACT1 truncado	Este trabalho
pGlnDACT2-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com o domínio ACT2 truncado	Este trabalho
pGlnDACT1-M11	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> com o domínio ACT3 truncado	Este trabalho

Meios de cultura e condições de crescimento

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C no meio líquido Luria-Bertani (LB), e o meio sólido utilizado foi Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook, 1989).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para verificar a atividade dos domínios ACT proteína GlnD de *H. seropedicae*, foi realizada uma análise *in silico* de diferentes pontos de truncagem do domínio ACT (GlnD ACT1, GlnD ACT2 e GlnD ACT3). O fragmento de gene que codifica os domínios ACT de GlnD de *H. seropedicae* foi clonado no vetor pETM11, para a expressão da proteína com cauda His N-terminal. 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.

Tabela 2 – Lista de oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR. Os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição estão sublinhados

Oligonucleotídeos	Sequência 5' -3'
GlnD ACT1_Fwd	CATAC <u>ATATGGT</u> CGATACCGCCGTGCCGCTGGT
GlnD ACT2_Fwd	CATAC <u>ATATGGT</u> CTACACGCCGGACCGCAAGACC
GlnD ACT3_Fwd	CATAC <u>ATATGGG</u> GCGAAGAACCTTCGGCCGACCG
ACT_Rev	GATCT <u>GGATCCT</u> CAGATGCGCAGGGTCTTGAGCAG

Manipulação do DNA

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

A purificação de plasmídeos foi realizada através do método de lise alcalina. 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.

Superexpressão de proteínas

O plasmídeo contendo o gene codificador da proteína a ser purificada sob controle do promotor T7, ou seja, o clone positivo, foi transformado na estirpe BL21(DE3) de *E. coli*. A expressão da proteína foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 4 horas a 37°C. Após indução as células foram coletadas por centrifugação e o pellet estocado a -20°C até o momento do uso. O resultado da expressão foi visualizado pela eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

Purificação de proteínas recombinantes

Para a purificação, as células contendo as proteínas superexpressas foram lisadas por sonicação, e o extrato clarificado por centrifugação para a obtenção da fração de proteínas solúveis.

A proteína GlnK foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica Heparina (GE – healthcare). As proteínas GlnD truncadas foram purificadas utilizando uma coluna de afinidade Hi-Trap Chelating HP (GE – healthcare) carregada com níquel.

Devido à insolubilidade da proteína após tentativas de purificação usando as condições normais de tampão para a proteína GlnD selvagem, todas as proteínas truncadas foram purificadas com tampão com ureia 8 M. Neste caso, a fração solúvel coletada após a sonicação em tampão A sem ureia (50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 20 mM de Imidazol), foi centrifugada, ressuspensa em tampão A com ureia (50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 20 mM de Imidazol e 8 M ureia) centrifugada novamente, injetada na coluna de volume de 5 mL e pré-equilibrada com tampão A com ureia. A eluição das proteínas foi feita através de um gradiente linear até 100% de tampão B (50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 1M de Imidazol e 8 M de ureia). O eluato do gradiente foi fracionado em microtubos de 1,5 mL e avaliado em gel de poliacrilamida através de eletroforese de proteínas em condições desnaturantes.

As frações coletadas foram purificadas e dialisadas contra seu próprio tampão de lise sem imidazol. As concentrações das proteínas recombinantes purificadas foram determinadas medindo-se suas absorvâncias a 280 nm no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Eletroforese de proteína em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante foram realizadas conforme descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% (m/v) (para GlnD) ou de 14% (m/v) (para PII) e do gel de empilhamento foi de 4%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo orientação do fabricante (Bio-Rad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 M de Tris-HCl pH6,8, 5% de β mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação. A voltagem da corrida foi a 200 V, utilizando o tampão descrito por Laemmli (25 mM de Tris-base, 192 mM de Glicina e 0,1% de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com o corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

Eletroforese de Proteínas em condições não desnaturantes (NATIVO)

As eletroforeses de proteínas em gel não desnaturante foram realizadas conforme protocolo descrito Forchhamer & Tandeau de Marcsac (1994). O gel separador continha acrilamida 9% (reação acrilamida:bis-acrilamida 29:1), Tris-HCl 450 mmol/L pH 8,9, Nonidet P-40 0,025%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha 2,5% (solução estoque 10% de acrilamida e 2,5% de bis-acrilamida), Tris-H₃PO₄ 62,5 mmol/L pH 6,9, Nonidet P-40 0,031%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%.

O tampão de amostra não desnaturante foi preparado 5 vezes concentrado (Tris-HCl 250 mmol/L pH 6,8, EDTA 20 mmol/L, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,02%). As corridas foram realizadas em gelo a 100 V por 4 horas em tampão de corrida para proteína nativa (Tris 5 mmol/L e glicina 38,4 mmol/L).

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

A uridililação das proteínas PII foi feita como descrito anteriormente (Oliveira *et al*, 2015). O sistema de uridililação continha ATP (200 μ M), 2-OG (5 mM), UTP (5 mM), GlnK (300 μ M) e GlnD (10 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,

mantidas em estufa durante a noite a 37°C e paradas por aquecimento a 70°C por 10 minutos. Em cada reação, a uridililação foi avaliada através da eletroforese em gel não desnaturante. Posteriormente a reação foi extensivamente dialisada contra um tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM NaCl.

Ensaio de uridililação e desuridililação de GlnK

As reações de uridililação e desuridililação foram feitas com GlnK/GlnK-UMP₃ (30 µM) em tampão de reação (100 mM Tris-Cl pH 7; 100 mM KCl e 25 mM de MgCl₂ ou MnCl₂ respectivamente). Nucleotídeos (ATP ou ADP), glutamina e 2-OG foram adicionados de acordo com a descrição em cada experimento. As reações foram pré-incubadas por 10 minutos a 37°C e disparadas com GlnDΔACT (2 µM). As reações foram interrompidas com 3,3 volumes de tampão de amostra nativo (Tris-HCl pH 6,8 (250 mM), EDTA (20 mM), glicerol (50%) e azul de bromofenol (0,02%)). Para a verificação do estado de desuridililação da proteína GlnK, as reações foram aplicadas em gel de eletroforese nativo corados com corante Coomassie Blue.

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

RESULTADOS

Construção dos pontos de truncagem dos domínios ACT

Através de análise de alinhamentos dos resíduos de aminoácidos de GlnD de *H. seropedicae* com outras proteínas ortólogas e da estrutura secundária predita da mesma, foram definidos pontos de truncagem para expressão dos domínios ACT desta proteína isolados, procurando não interromper nenhuma estrutura secundária. Foram construídas três versões dos domínios ACT truncados, chamadas de ACT1, ACT2 e ACT3. Os pontos de truncagem de cada um dos domínios estão mostrados na figura 1. Os fragmentos que codificam essas versões truncadas dos domínios ACT foram produzidos através de reações de PCR (Figura 2).

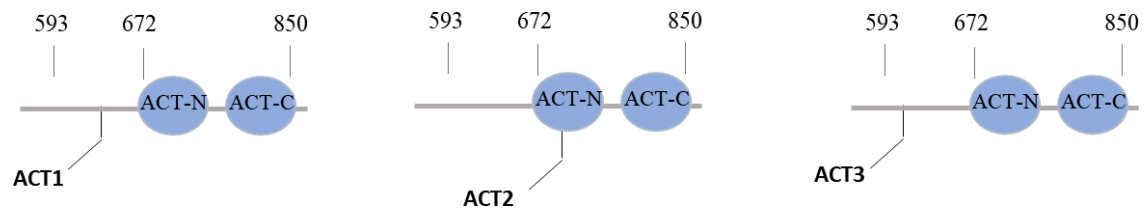


Figura 1. Pontos de truncagem dos domínios ACT da proteína GlnD de *H. seropedicae*

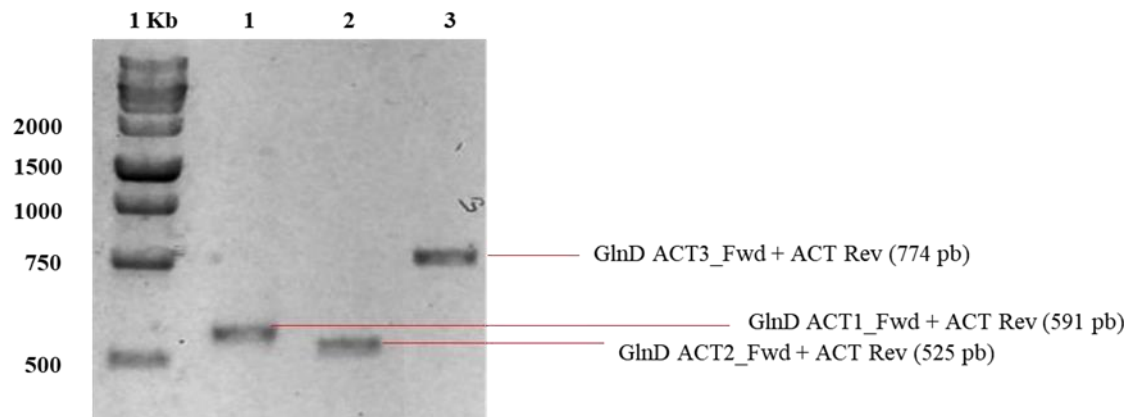


Figura 2. Eletroforese dos fragmentos do gene *glnD* codificantes dos domínios ACT truncados. 1. GlnD ACT1. 2. GlnD ACT2. 3. GlnD ACT3. As reações de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e as bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira banda contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Sinapse), 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.

Clonagem dos genes codificadores das versões truncadas dos domínios ACT

As ligações foram transformadas na estirpe TOP10 de *E. coli* e as colônias inoculadas em meio líquido. Os DNAs dos clones foram extraídos e analisados por restrição com as enzimas *XbaI/BamHI*. As eletroforeses das restrições dos mutantes obtidos estão mostradas na figura 3.

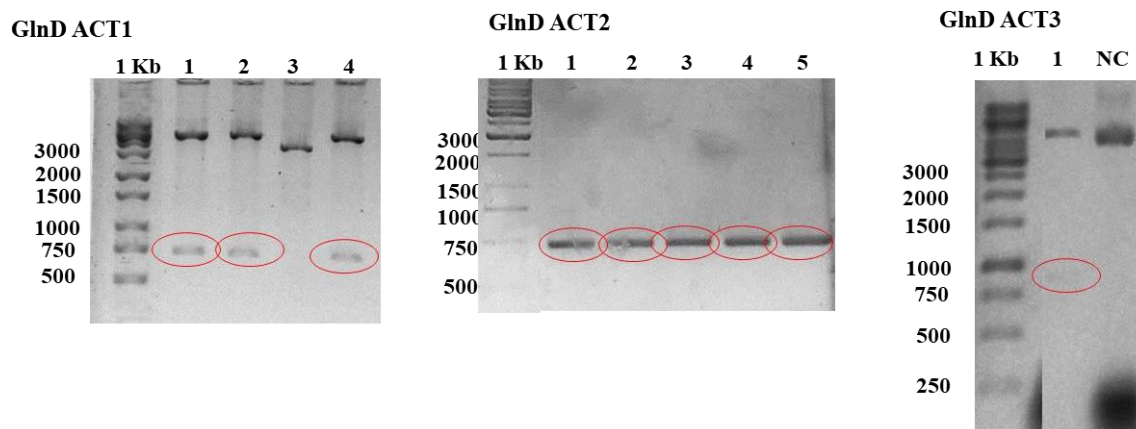
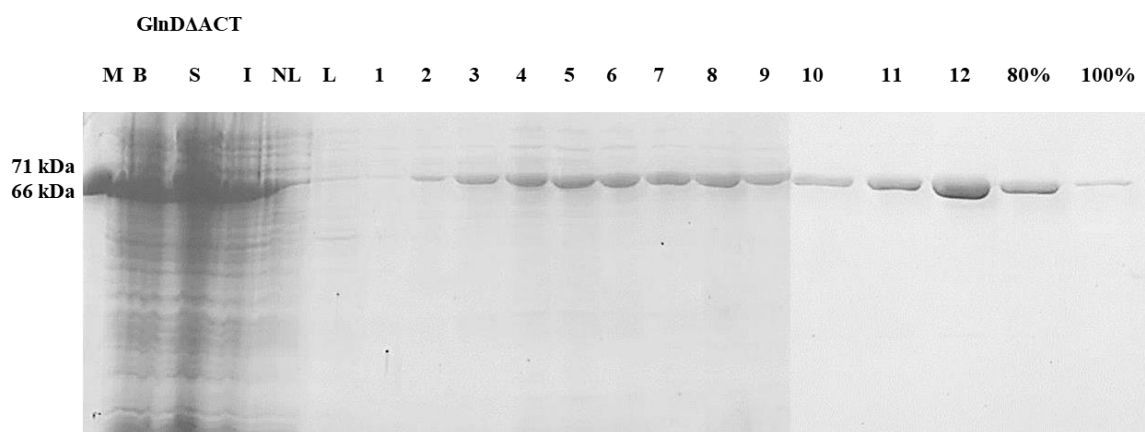


Figura 3. Confirmação dos clones dos pontos de truncagem GlnD ACT1, GlnD ACT2 e GlnD ACT3. As reações de restrição foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e as bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira banda contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Sinapse), com os respectivos tamanhos em número de pares de base indicados. Os clones de cada mutante estão circulado em vermelho.

Purificação das proteínas

A análise dos géis SDS-PAGE das purificações indica que todas as proteínas foram superexpressas e purificadas com alto grau de pureza (Figura 4). Além das proteínas truncadas, uma versão truncada de GlnD sem os dois domínios ACT de sua porção C-terminal, a proteína GlnD Δ ACT, também foi produzida. Essa proteína já foi caracterizada anteriormente (Emori *et al*, 2018).



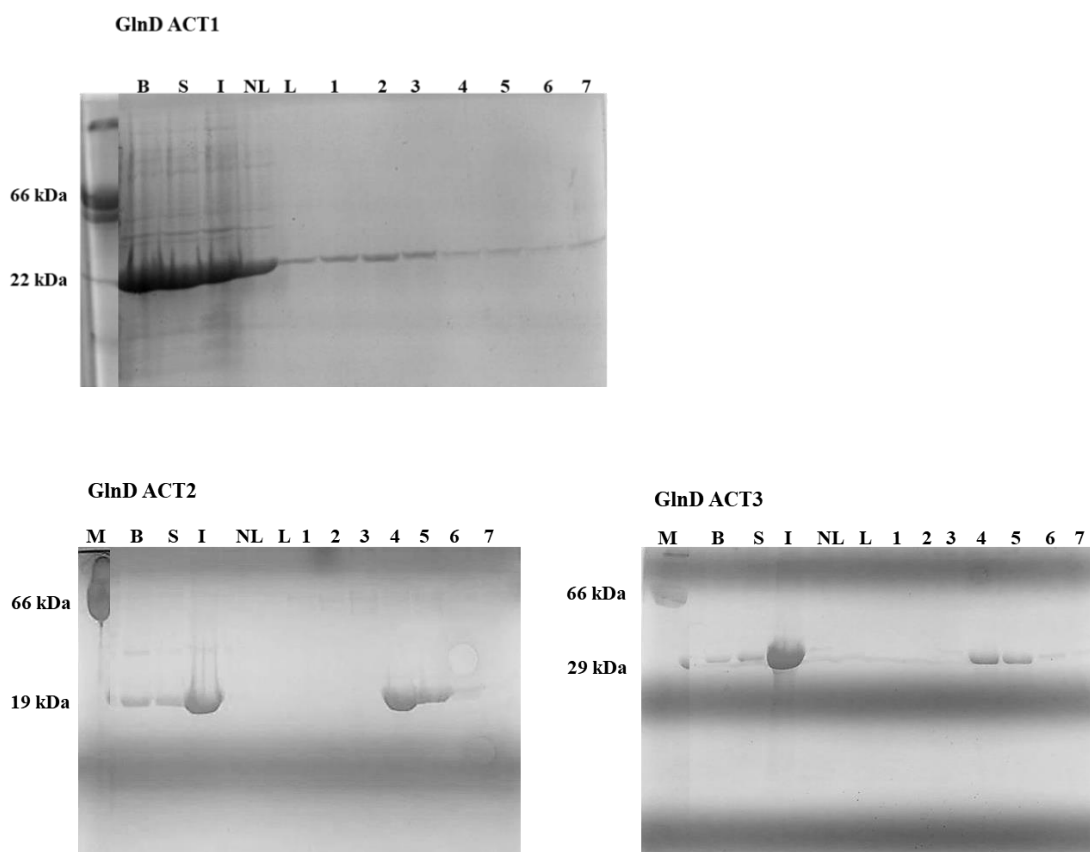


Figura 4. Purificação das proteínas GlnD Δ ACT, GlnD ACT1, GlnD ACT2 e GlnD ACT3. As frações em gradiente de imidazol foram avaliadas em gel de poliacrilamida através de eletroforese de proteínas em condições desnaturantes. O marcador utilizado foi a albumina de soro bovino (BSA – 66 kDa). São indicadas também, as frações: bruta (B), solúvel (S), insolúvel (I), não-ligada na coluna (NL), a lavagem da coluna (L) e o gradiente de imidazol.

Uridililação catalisada por GlnD Δ ACT e pelas variantes truncadas

Em sua forma trimérica, as proteínas PII possuem três sítios de uridililação e podem ser encontradas na forma não modificada ou ligada a um, dois ou três grupamentos UMP, ou seja, PII (UMP), PII (UMP)₂ e PII (UMP)₃ (Bonatto *et al*, 2012). Os domínios ACT da enzima GlnD possuem um papel regulatório, promovendo uma regulação recíproca das atividades UTase e UR. Assim, a proteína GlnD Δ ACT catalisa um ciclo fútil de uridililação/desuridililação da proteína PII até o total consumo do substrato UTP presente na reação (Emori *et al*, 2018). Quando o UTP é exaurido, a GlnD Δ ACT catalisa exclusivamente a desuridililação de PII, e o produto final da reação é a PII não modificada. Dessa forma, aumentos da concentração de UTP permitem observar a uridililação por um maior tempo. Na GlnD selvagem, os domínios ACT sensoriam a presença do 2-OG para inibir a atividade UR e estimular a atividade UTase. Aqui, foi

testada a capacidade das versões truncadas dos domínios ACT de prevenir *in trans* o ciclo fútil catalisado pela enzima GlnD Δ ACT na presença do efetor 2-OG, como acontece na GlnD selvagem. Conforme mostrado na figura 5, a variante truncada ACT1 mostrou maior atividade de regulação, no entanto, ACT2 e ACT3 também parecem prevenir em menor grau o ciclo fútil catalisado por GlnD Δ ACT. Isso mostra que os domínios ACT parecem ter sido capazes de formar um complexo intermolecular com a GlnD Δ ACT para regular a atividade desta em resposta ao regulador alostérico.

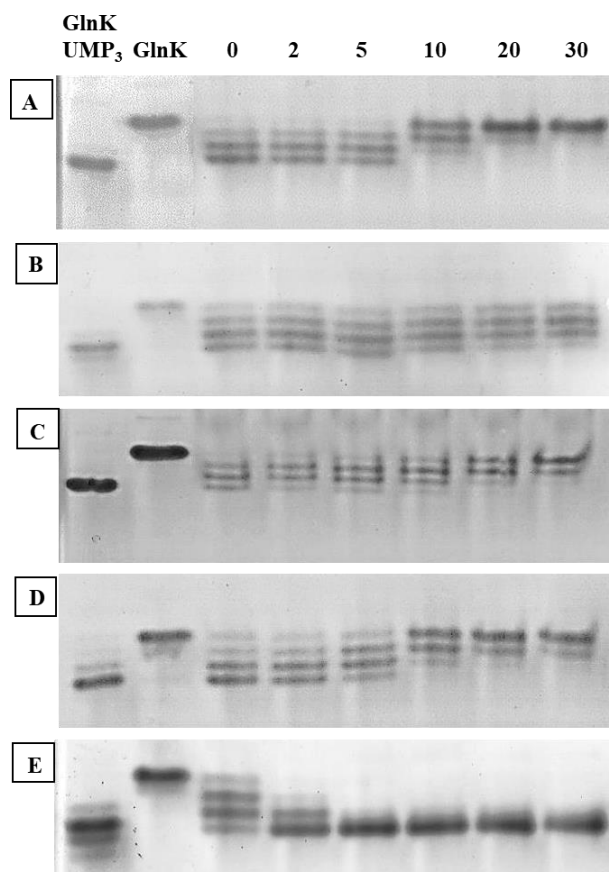


Figura 5. Uridilação de GlnK catalisada por GlnD Δ ACT e pelas variantes truncadas. As proteínas utilizadas para catalisar as reações foram **A.** GlnD Δ ACT, **B.** GlnD ACT1, **C.** GlnD ACT2, **D.** GlnD ACT3 e **E.** GlnD selvagem. As reações continham 30 μ M GlnK, 1 mM ATP, 2 mM 2-OG, 0,2 mM UTP, e foram disparadas com 5 μ M de cada proteína. 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 e corado com Coomassie Blue.

Regulação da atividade UR de GlnD Δ ACT pelos domínios truncados

A fim de explorar as regulações das atividades UR pelos domínios truncados, experimentos com excesso de concentração das variantes truncadas em relação a GlnD Δ ACT foram realizados. Este experimento é importante pois em GlnD Δ ACT, o 2-OG não inibe a desuridililação, enquanto que na proteína selvagem não há nenhuma ou muito pouca atividade UR na presença desse metabólito. Ao testarmos a atividade UR da enzima GlnD Δ ACT na presença das variantes truncadas ACT2 e ACT3 na proporção 1:4, a curva se desloca, mostrando que estas variantes devolveram parte da sensibilidade ao 2-OG para a GlnD Δ ACT. Porém, a variante ACT1 apresentou um resultado ainda mais evidente dessa regulação (Figura 6A). Para demonstrar a especificidade regulatória do fenômeno, nós testamos o efeito da glutamina sobre o sistema (Figura 6B). A glutamina na proteína selvagem não inibe a atividade UR da enzima. O resultado mostrou que na presença de glutamina, o domínio ACT de fato não inibiu a atividade UR da enzima GlnD Δ ACT, indicando que o mecanismo regulatório da GlnD selvagem foi restaurado pela versão truncada ACT1. Por outro lado, ao adicionar ACT2 e ACT3, a atividade UR de GlnD Δ ACT foi máxima

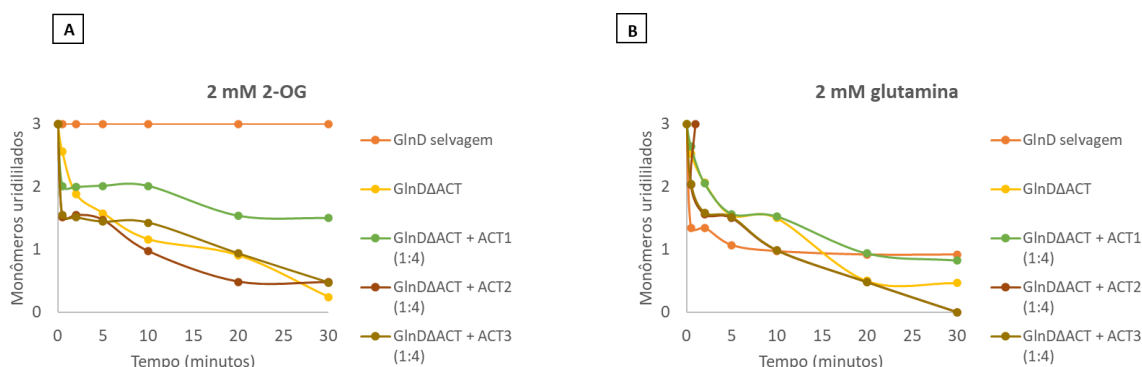


Figura 6. Regulação da atividade de desuridililação de GlnK-UMP₃ pelos efetores moleculares (A) 2-OG e (B) glutamina catalisada por GlnD selvagem, GlnD Δ ACT, ACT1, ACT2 e ACT3. As reações continham 30 μ M de GlnK-UMP₃ e 2 mM de 2-OG ou 2 mM de glutamina. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

Além disso, devido à versão truncada ACT1 ter apresentado uma melhor regulação no ciclo fútil e na regulação da atividade de desuridililação por 2-oxoglutarato, mantivemos a proporção 1:4 de GlnD Δ ACT e GlnD ACT1 com os efetores 2-OG e

glutamina e avaliamos a influência dos nucleotídeos ATP e ADP (Figura 7). Nesse caso, quando 2-oxoglutarato foi utilizado (7A), a mesma atividade UR foi observada independente da presença ou não dos efetores, ao passo que quando glutamina (7B) foi utilizada, uma maior atividade UR foi observada na presença de ATP.

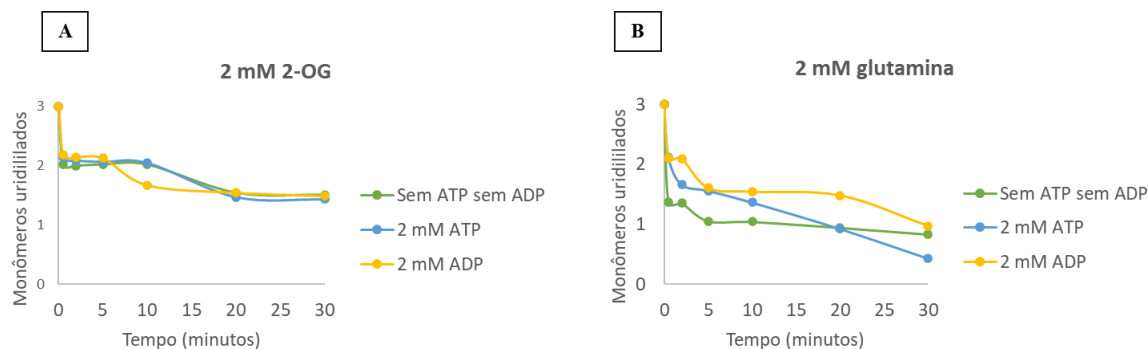


Figura 7. Avaliação da influência dos nucleotídeos ATP e ADP na regulação da atividade de desuridilação de GlnK-UMP₃ pelos efetores (A) 2-OG e (B) glutamina catalisada por GlnDΔACT + ACT1. As reações continham 30 μM de GlnK-UMP₃ e 2 mM de 2-OG ou 2 mM de glutamina. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μL foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

Construção, clonagem e purificação do gene mutante GlnD ACT1 A713D

Devido ao fato de a variante truncada GlnD ACT1 ter apresentado melhor regulação como mostrado nos experimentos anteriores, construímos uma variante GlnD ACT1 com a mutação A713D, que, como discutido no artigo 1, não apresentou sensibilidade aos efetores glutamina e 2-OG. A construção dessa variante foi realizada através de reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos da reação GlnD ACT1 e o clone mutante GlnD A713D foi usado como molde (Figura 8).

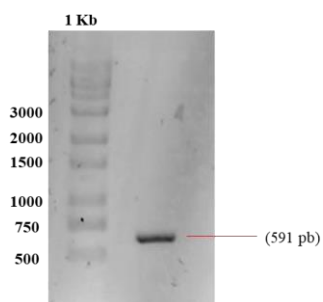


Figura 8. Eletroforese do fragmento do gene *glnD* codificante do mutante truncado ACT A713D. A reação de PCR foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e as

bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira banda contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Sinapse), com os respectivos tamanhos em número de pares de base indicados. A banda do fragmento também está indicada, com o respectivo tamanho esperado ao lado.

A ligação foi transformada na estirpe TOP10 de *E. coli* e as colônias inoculadas em meio líquido. O DNA do clone foi extraído e analisado por restrição com as enzimas *XbaI/BamHI*. A eletroforese da restrição do mutante obtido está mostrada na figura 9.

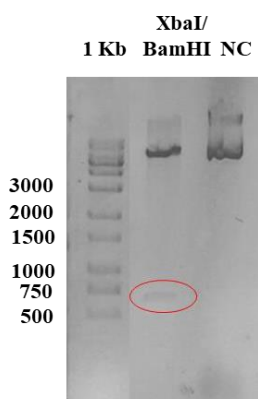


Figura 9. Confirmação da clonagem do mutante truncado GlnD ACT A713D. A reação de restrição foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e as bandas visualizadas em transiluminador UV. A primeira banda contém o marcador de tamanho de DNA 1Kb ladder (Sinapse), com os respectivos tamanhos em número de pares de base indicados. O clone está circulado em vermelho.

A análise do gel SDS-PAGE da purificação indica que a proteína foi superexpressa e purificada (Figura 10).

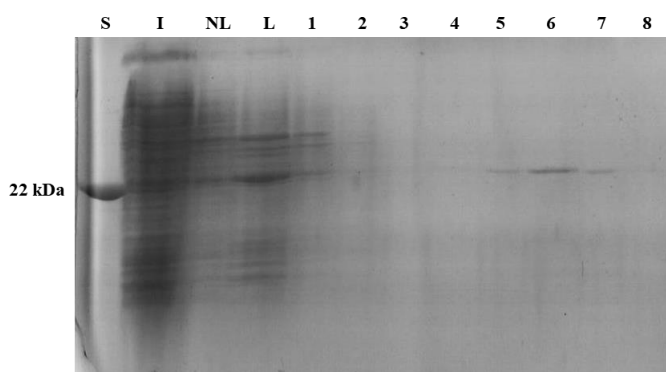


Figura 10. Purificação do mutante truncado GlnD ACT A713D As frações em gradiente de imidazol foram avaliadas em gel de poliacrilamida através de eletroforese de proteínas em condições desnaturantes. São indicadas também, as frações: solúvel (S), insolúvel (I), não-ligada na coluna (NL), a lavagem da coluna (L) e o gradiente de imidazol.

Regulação da atividade UR do mutante truncado GlnD ACT A713D

A fim de comparar os efeitos dos efetores glutamina e 2-OG nas proteínas GlnD Δ ACT, GlnD Δ ACT+GlnD ACT1 (1:1) e da variante mutante GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 A713D (1:1), cinéticas foram realizadas. Neste experimento, mantemos fixa a concentração de 2-OG em 2 mM e variamos a concentração de glutamina. Como mostrado na figura 10 abaixo, o 2-OG não inibe a desuridililação em GlnD Δ ACT (11A). A atividade de GlnD ACT1 por outro lado, foi concentração-dependente com relação aos dois efetores (11B), e confirmando novamente o fenótipo de A713D, o mutante truncado não foi capaz de sentir variações de glutamina (11C).

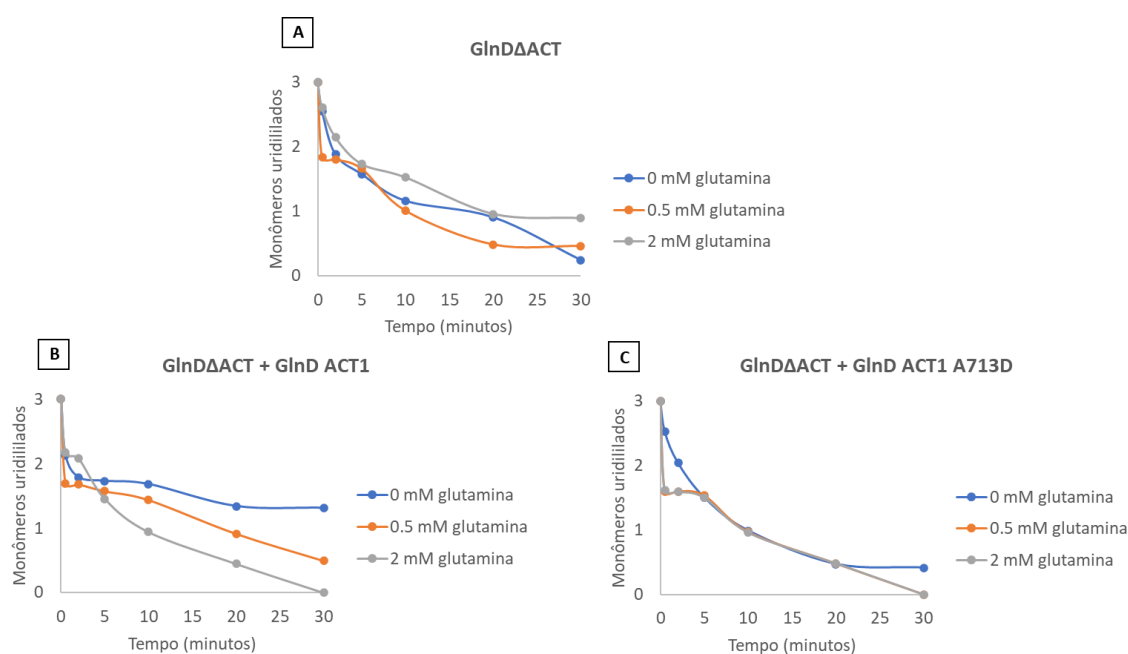


Figura 11. Efeito da glutamina na desuridililação de GlnK-UMP₃ catalisada por A. GlnD Δ ACT, B. GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 e C. GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 A713D. As reações continham 30 μ M de GlnK-UMP₃, 2 mM de 2-OG e glutamina nas concentrações demonstradas. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

Por fim, ao utilizarmos uma proporção 1:4 e mantermos fixa a concentração de glutamina em 2 mM e variarmos a concentração de 2-OG (Figura 12), podemos confirmar novamente o fenótipo de A713D incapaz de sentir variações de 2-OG (12C)

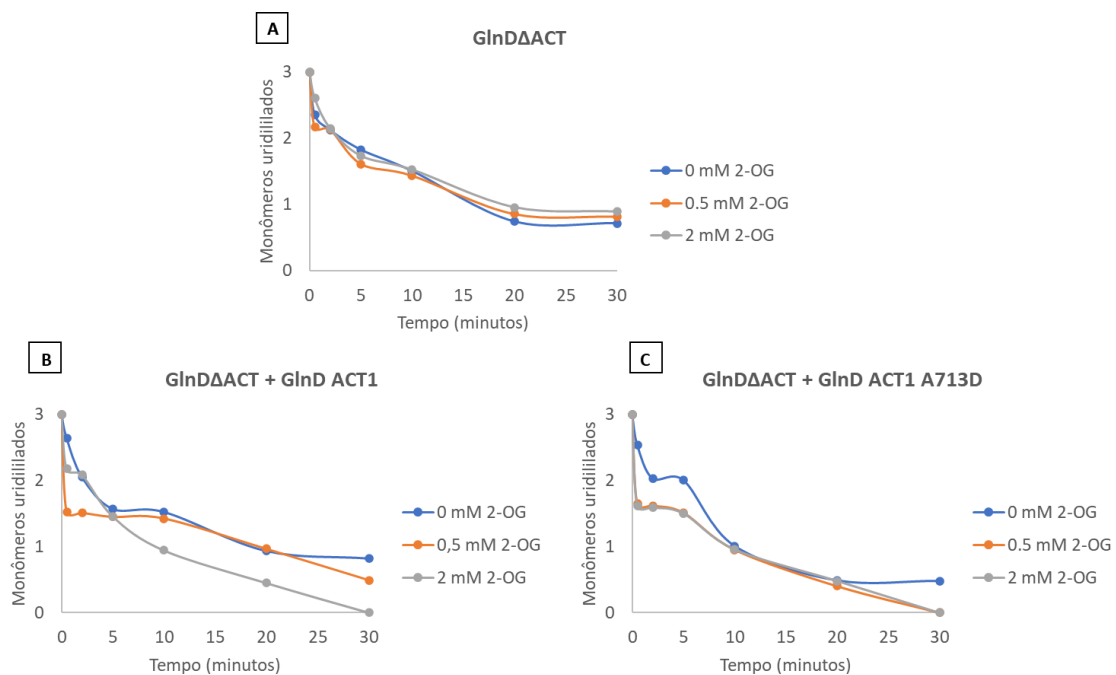


Figura 12. Efeito do 2-OG na desuridilação de GlnK-UMP₃ catalisada por A. GlnD Δ ACT, B. GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 e C. GlnD Δ ACT + GlnD ACT1 A713D. As reações continham 30 μ M de GlnK-UMP₃, 2 mM de glutamina e 2-OG e nas concentrações demonstradas. Em cada tempo indicado, uma alíquota de 10 μ L foi retirada e a reação da alíquota foi parada após a adição de 20 mM EDTA. Durante todo o tempo de reação, as misturas foram mantidas a 37°C. O produto foi submetido a um PAGE não desnaturante, e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondentes a cada estado de modificação foram quantificadas por densitometria para determinar a média ponderada de monômeros uridililados.

DISCUSSÃO

Para as bactérias diazotróficas, a fixação do nitrogênio atmosférico é uma rota importante de assimilação de nitrogênio, na qual as proteínas PII são responsáveis por desempenhar um papel importante na regulação deste processo (Arcondéguy *et al*, 2001). Em todas as células, as vias de utilização de nitrogênio têm que ser reguladas a fim de evitar uma perda desnecessária de energia e também de maximizar a utilização do nitrogênio disponível. O sistema Ntr compreende um conjunto de enzimas que controla o metabolismo do nitrogênio em bactérias e as enzimas que compõem esse sistema estão arrançadas em um complexo mecanismo em cascata (Merrick e Edwards, 1995). A proteína GlnD possui um papel chave na regulação desse sistema, controlando o estado de uridilação das proteínas PII através do sensoriamento dos níveis de glutamina (Jiang *et al*, 1998). As proteínas PII por sua vez, regulam a atividade das principais enzimas metabólicas e regulatórias, fatores de transcrição ou proteínas de transporte (Forchhammer, 2008).

A proteína GlnD é composta por 4 domínios. O domínio ACT, foco deste estudo, é um domínio regulatório encontrado em enzimas direta ou indiretamente envolvidas no metabolismo de aminoácidos e purinas (Aravind & Koonin, 1999; Chipman e Shaanan *et al*, 2001). Por serem domínios de detecção da razão 2-OG:glutamina, os domínios ACT desempenham papéis importantes para a regulação das atividades UTase e UR. Aqui, usando uma proteína truncada sem os domínios regulatórios C-terminais, mostramos um ciclo fútil de uridililação e desuridililação de GlnK sob condições de ensaio *in vitro* (Figura 5), confirmando o papel importante dos domínios do ACT para a regulação da atividade UR (Zhang *et al*, 2010). Isso é confirmado também com a adição do domínio ACT, no caso, demonstrado por GlnD ACT1, que foi capaz de regular este ciclo, enquanto que GlnD ACT2 e GlnD ACT3 apresentaram uma atividade regulatória menos pronunciada (Figura 5).

Zhang e colaboradores (2010) sugeriram que se a regulação de GlnD de *E. coli* fosse dependente apenas do nível de glutamina na célula, seria provável que o ciclo fútil de uridililação / desuridililação das proteínas PII também ocorra *in vivo*. Emori (2018) suportam um modelo onde a atividade UR de GlnD de *H. seropedicae* é inibida pelo 2-OG além da regulação pela glutamina, possivelmente evitando o ciclo fútil sugerido por esses autores. De fato, é necessário um mecanismo coordenado e refinado de regulação para permitir que a proteína GlnD de *H. seropedicae* seja capaz de integrar os sinais moleculares e module a atividade de PII de acordo com a disponibilidade de nitrogênio (Emori *et al*, 2018).

Além disso, fazendo uma correlação com o primeiro artigo, construímos uma variante mutante ACT com a mutação A713 e confirmamos novamente a insensibilidade desse resíduo aos efetores alostéricos glutamina e 2-OG.

A atividade regulatória dos domínios isolados mostrou que essas proteínas foram purificadas em uma conformação nativa. Os domínios regulatórios isolados podem ser mais facilmente purificados, e a pesquisa da interação deles com moléculas regulatórias é mais fácil do que em uma proteína selvagem multi-domínios. Adicionalmente, os domínios regulatórios isolados podem servir como plataformas de ensaios de mutagênese sítio-dirigida ou aleatória, permitindo a descrição detalhada e refinada da regulação das atividades UTase e UR da proteína GlnD. Portanto, o modelo experimental desenvolvido no presente trabalho fornece uma ferramenta para estudos estruturais e funcionais do mecanismo regulatório das atividades catalíticas de GlnD de *H. seropedicae*.

REFERÊNCIAS

ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. The HD domain defines a new super-family of metal-dependent phosphohydrolases. **Trends Biochem. Sci.**, v.23, p.469-472,1998.

ARAVIND, L. & KOONIN, E.V. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. **J. Mol. Biol.** v. 287, p. 1023–1040, 1999.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. & ARCONDE, T. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80–105, 2001.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BÁSTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.**v. 24, p. 7-11, 1998.

BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S. & RIGO, L.U. Evidence for Two Possible glnB -Type Genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, v, 179, p. 4623–4626, 1997.

BENELLI, E.M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; DE SOUZA, E.M.; CRUZ, L.M. & PEDROSA, F.O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.** v.269, p. 3296–3303, 2002.

BONATTO, A.C.; COUTO, G.H.; SOUZA, E.M.; ARAÚJO, L.M.; PEDROSA, F.O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Prot. Express. Pur.**, v. 55, p. 293-299, 2007.

BONATTO, A.C.; SOUZA, E.M.; OLIVEIRA, M.A.S.; MONTEIRO, R.A.; CHUBATSU, L.S.; HUERGO, L.F.; PEDROSA, F.O. Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro. **Arch Microbiol**, v. 194, p. 643-652, 2012.

BROWN, M. S., A. SEGAL, and E. R. STADTMAN. 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, 1971.

CHEAH, E.; CARR, P.D.; SUFFOLK, P.M.; VASUDEVAN, S.G.; DIXON, N.E. & OLLIS, D.L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure** 2, p. 981–990, 1994.

CHIPMAN, D.M., and SHAANAN. B. The ACT domain family. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 11, p.694–700, 2001.

CHUBATSU, L.S.; MONTEIRO, R.A.; DE SOUZA, E.M.; OLIVEIRA, M.A.S.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; BONATO, AC.; HUERGO, L.F.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 356, p. 197-207, 2012.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, p. 536-545, 2002.

DALLAKYAN, S. AND OLSON, A.J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods Mol Biol** 1263, p.243-250, 2015.

DIXON, R. and KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004

EMORI, M.T.; TOMAZINI, L.F.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; OLIVEIRA, M.A.S. The deuridylylation activity of *Herbaspirillum seropedicae* GlnD protein is regulated by the glutamine:2-oxoglutarate ratio. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*1866(12), p. 1216- 1223, 2018.

FERIA BOURRELLIER, A.B.; VALOT, B.; GUILLOT, A.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; VIDAL, J.; and HODGES, M. Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate–regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. **PNAS.**, v. 107, p. 502-507, 2010.

FORCHHAMMER, K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends Microbiol.** 16(2), p. 65-72, 2008.

FORCHHAMMER K. & TANDEAU DE MARSAC N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **J Bacteriol.** 176, p. 84–91, 1994.

GERHARDT, E.C.M.; ARAÚJO, L.M.; RIBEIRO, R.R.; CHUBATSU, L.S.; SCARDUELLI, M.; RODRIGUES, T. E.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. and HUERGO, L.F. Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signalling. **Microbiology**, 158, p. 1656-1663, 2012.

GERHARDT, E.C.M.; PARIZE, E.; GRAVINA, F.; PONTES, F.L.D.; SANTOS, A.R.S.; ARAÚJO, G.A.T.; GOEDERT, A.C.; URBANSKI, A.H.; STEFFENS, M.B.R. *et al.* The Protein-Protein Interaction Network Reveals a Novel Role of the Signal Transduction Protein PII in the Control of c-di-GMP Homeostasis in *Azospirillum brasilense*. **mSystems**, v. 5, e00817-20, 2020.

GERHARDT, E.C.M.; RODRIGUES, T.E.; MULLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.N.; FORCHHAMMER, K. and HUERGO, L.F. The bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fattyacid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Molecular Microbiology**, 95(6), p. 1025-1035, 2015.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum-tolerant rice varieties. **New Phytol.**, v. 154, p. 131-145, 2002.

HO, S.N.; HUNT, H.D.; HORTON, R.M.; PULLEN, J.K.; PEASE, L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, p. 51-59, 1989.

HUERGO, L.F. and DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 79, p. 419-435, 2015.

HUERGO, L.F.; CHANDRA, G. & MERRICK, M. PII signal transduction proteins: Nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 37, p. 251–283, 2012.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. 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**, v. 37, p. 12782-12794, 1998

JIANG, P. & NINFA, A.J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. **Biochemistry**, v. 46, p. 12979-96, 2007.

JONSSON, A. & NORDLUND, S. *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.** v.189, p. 3471–3478, 2007.

JUMPER, J., EVANS, R., PRITZEL, A., GREEN, T., FIGURNOV, M., RONNEBERGER, O., TUNYASUVUNAKOOL, K., BATES, R., ZIDEK, A., POTAPENKO, A., *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**. 596, p. 583-589, 2021.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LITTLE, R.; SALINAS, P.; SLAVNY, P.; CLARKE, T.A.; DIXON, R. Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. **Mol. Microbiol.** 82(1): 222-235, 2011.

LLACER, J.L.; CONTRERAS, A.; FORCHHAMMER, K. MARCO-MARIN, C.; GIL-ORTIZ, F.; MALDONADO, R.; FITA, I. & RUBIO, V. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. **P Natl Acad Sci USA** 104: 17644–17649, 2007.

MANGUM, J.H., G. MAGNI, and E.R. STADTMAN. Regulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation by the enzymatic uridylylation and deuridylylation of the PII regulatory protein. **Arch. Biochem. Biophys.** 158:514–525, 1973

MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Front Microbiol.** 6;5:763, 2015.

MERRICK, M.J. & EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MIRDITA, M., SCHUTZE, K., MORIWAKI, Y., HEO, L., OVCHINNIKOV, S., AND STEINEGGER, M. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nat Methods**, 2022.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A.M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S. *et al.* *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil.**, v. 356, p. 175–196, 2012.

MOURE, V.R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, L.M.; OLIVEIRA, M.A.S.; GERHARDT, E.C.M.; MULLER-SANTOS, M.; ALMEIDA, F.; PEDROSA, F.O.; VALENTE, AP.; SOUZA, E.M.; HUERGO, L.F. Heat stability Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression and Purification**, v. 81, p. 83-88, 2012.

NINFA, A.J. & ATKINSON, M.R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.** v. 8, p. 172–179, 2000.

NOINDORF, L.; BONATTO, A. C.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.R.; CHUBATSU, L.S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiology**, 11:8, 2011.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Characterization of the orf1glnKamtB operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.

OLIVARES, F.L.; JAMS, E.K.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugarcane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **New Phytol.**, v. 135, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, M.A.S.; GERHARDT, E.C.M.; HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. 2-Oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 4797–4809, 2015.

PANKIEVICZ, V.C.; do AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.; AGTUCA, B.; SCHUELLER, M.J.; ARISI, A.C.; Steffens, M.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; STACEY, G.; FERRIERI, R.A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant J.**, v. 81, p. 907-19, 2015.

PETTERSEN, E.F., GODDARD, T.D., HUANG, C.C., COUCH, G.S., GREENBLATT, D.M., MENG, E.C., AND FERRIN, T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** 25, p. 1605-1612, 2004.

RADCHENKO, M. & MERRICK, M. The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 39, p. 189–194, 2011.

REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-176, 2003.

SANTOS, A.R.S.; GERHARDT, E.C.M.; PARIZE, E. PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.R.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M. *et al.* NAD⁺ biosynthesis in bacteria is controlled by global carbon/nitrogen levels via PII signaling. **J. Biol. Chem.** V, 295, p. 6165–6176, 2020.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2ed., 1989.

SANT'ANNA, F. H.; TRENTINI, D.B.; WEBER, SHANA de SOUTO.; CECAGNO, R.; da SILVA, S.C.; SCHRANK, I.S. The PII Superfamily Revised: A Novel Group and Evolutionary Insights. **J. Mol Evol.** 68: 322-336, 2009.

SCHULLER, D.J; GRANT, G. A. and BANASZAK, L.J. The allosteric ligand site in the V_{max}-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. **Nat. Struct. Biol.**, v, 2, p. 69–76, 1995

SCHUMACHER, J.; BEHRENDTS, V.; PAN, Z., BROWN, D.R.; HEYDENREICH, F.; LEWIS, M.R.; BENNETT, M.H.; RAZZAGHI, B.; KOMOROWSKI, M.;BARAHONA, M.; STUMPF, M.P.H.; WIGNESHWERARAJ, S.; BUNDY, J.B.; BUCK, M. Nitrogen and Carbon Status Are Integrated at the Transcriptional Level by the Nitrogen Regulator NtrC In Vivo. **mBio.**, v. 4, e 00881-13, 2013.

SHAPIRO, B.M. The glutamine synthetase deadenylyating enzyme system from *Escherichia coli*: resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, v. 8, p.659–670, 1969.

SHETTY, N.D.; REDDY, M.C.M.; PALANINATHAN, S.K.; OWEN, J.L.; SACCHETTINI, J.C. Crystal structures of the apo and ATP bound *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen regulatory PII protein. *Protein Sci.*; 19(8), p. 1513-1524, 2010.

SON, H.S. & RHEE, S.G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J Biol Chem** 262: 8690–8695, 1987.

STROSSER, J.; LUDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRAMER, R. & BURKOVSKI, A. 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, 2004.

TEIXEIRA, P.F.; JONSSON, A., FRANK, M. WANG, H. and NORDLUND, S. Interaction of the signal transduction protein GlnJ with the cellular targets AmtB1, GlnE and GlnD in *Rhodospirillum rubrum*: Dependence on manganese, 2-oxoglutarate and the ATP/ADP ratio. **Microbiology**. v.154, p. 2336-2347, 2008.

TØNDERVIK, A.; TORGERSEN, H.R.; BOTNMARK, H.K.; STRØM, A.R. 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.**, v. 188, p. 4218-4226, 2006.

TROTT, O., and OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry** 31, p. 455-461, 2010.

TRUAN, D.; HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S.; MERRICK, M.; LI, X.D.; WINKLER, F.K. A new P(II) protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **J. Mol. Biol.**, v. 400, p. 531-539, 2010.

UNIPROT, C. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 49, D480-D489, 2021.

WILLIAMS, K.J.; BENNET, M.H.; BARTON, G.R.; JANKINS, V.A.; ROBERTSON, B.D. Adenylylation of mycobacterial GlnK (PII) protein is induced by nitrogen limitation. **Tuberculosis**, v. 93, p. 198-206, 2013.

XU, Y.; CARR, P.D.; HUBER, T.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. The structure of the PII-ATP complex. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2028-2037, 2001.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J Mol Biol.** 282 (1), p. 149-165, 1998.

YURGEL, S.N.; RICER, J.; KAHN, M. Transcriptome analysis of the role of GlnD/GlnNK in Nitrogen Stress adaptation by *Sinorhizobium mililoti* Rm1021., v.8, **PLoS ONE** 8(3): e58028. doi:10.1371/journal.pone.0058028, 2012.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L., and ROBERTS, G.P. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 1254–1265, 2005.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L.; SERATE, J.; CONRAD, M.C. & ROBERTS, G.P. Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 2711–2721, 2010.