

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREY WESLEY DE SOUZA

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E BIOTINILAÇÃO DA PROTEÍNA  
CARREADORA DE CARBOXIL BIOTINA (BCCP) E DA SUBUNIDADE  $\alpha$  DA  
ACETIL/PROPIONIL-CoA CARBOXILASE (PCC) DE *Azospirillum brasilense***

CURITIBA

2017

ANDREY WESLEY DE SOUZA

**OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E BIOTINILAÇÃO DA PROTEÍNA CARREADORA  
DE CARBOXIL BIOTINA (BCCP) E DA SUBUNIDADE  $\alpha$  DA ACETIL/PROPIONIL-  
CoA CARBOXILASE (PCC) DE *Azospirillum brasilense***

Monografia apresentada à disciplina de Estágio Curricular em Biologia, como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharel em Ciências Biológicas, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo.  
Co-orientadora: Dra. Edileusa C. Marques Gerhardt

CURITIBA

2017

## TERMO DE APROVAÇÃO

ANDREY WESLEY DE SOUZA

OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E BIOTINILAÇÃO DA PROTEÍNA CARREADORA DE CARBOXIL BIOTINA (BCCP) E DA SUBUNIDADE  $\alpha$  DA ACETIL/PROPIONIL-CoA CARBOXILASE (PCC) DE *Azospirillum brasilense*

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná.

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

Orientador – Departamento: Câmara do Curso de Gestão Ambiental – Setor Litoral. Universidade Federal do Paraná.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia Bonatto

Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná.

---

Dr<sup>a</sup>. Vivian Rotuno Moure

Departamento de Química. Universidade Federal do Paraná.

Curitiba

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr<sup>o</sup> Luciano Fernandes Huergo pela orientação no desenvolvimento desse trabalho, pelo apoio, confiança e toda dedicação.

A Dr<sup>a</sup> Edileusa Cristina Marques Gerhardt e Dr<sup>a</sup> Vivian Rotuno Moure, as principais responsáveis pelo meu ingresso no campo da pesquisa, por toda a dedicação, paciência, companheirismo, apoio profissional e suporte prestado nos últimos anos. Obrigado por serem profissionais exemplares, que me ensinaram muito além dos conhecimentos específicos, me ensinaram a amar o que eu faço e fazê-lo por amor. Sempre as terei como importantes referências na minha vida pessoal e profissional.

Aos colegas do Núcleo de Fixação Biológica do Nitrogênio, pela ajuda, companheirismo diário e pelos momentos de descontração.

Aos amigos com os quais tive o prazer e a satisfação de caminhar ao longo de toda a graduação, por toda a parceria, ajuda, tardes de estudo, por todos os conselhos e por todos os momentos em que foram o diferencial fundamental para tornar o peso e a responsabilidade da graduação mero detalhe. Em especial, a vocês: João F. Coimbra Brosin (meu irmão de outra mãe), Bruno Gomes (pai de todos e parceiro mor), Aline Machado de Oliveira (companheira exemplar e símbolo de amizade), Priscila Lemes Gross (Tata Werneck da minha vida) e Yasmin Cartaxo Lima (por sempre estar ao meu lado e pelo companheirismo e cumplicidade).

Aos excelentes professores com quem tive o privilégio de aprender e conhecer no decorrer da graduação, pelo exemplo, serenidade, ensinamentos e inspiração.

Aos meus familiares por toda a paciência, apoio emocional, dedicação e suporte em todas as minhas escolhas. Obrigado por sempre acreditarem no meu potencial.

It was LEGEN... wait for it... DARY!  
(Barney Stinson – How I Met Your Mother)

## RESUMO

Proteínas da família PII são transdutoras de sinal, sendo conhecidas principalmente por seu papel de regulação e coordenação no metabolismo do nitrogênio. Recentemente foi mostrado que proteínas PII são capazes de regular enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono através da interação direta com a subunidade BCC (Proteína Carreadora de Carboxil Biotina) da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC), o que sugere que as proteínas PII podem sensoriar os níveis de carbono celular. O primeiro indicio da interação de PII em ACC em bactérias foi visto em *A. brasilense*, onde a subunidade BCCP foi encontrada ligada à GlnZ. Além de BCCP, outra acil-carboxilase foi encontrada como possível alvo de PII em *A. brasilense*, anotada como acetil/propionil-CoA carboxilase (PCC). Tanto BCCP quanto PCC são dependentes de biotinilação para serem funcionais. O papel das proteínas PII na regulação dessas enzimas é de particular interesse, uma vez que não se sabe qual a função das proteínas BCCP e PCC no metabolismo de *A. brasilense*. O presente trabalho teve por objetivo otimizar a expressão, purificação e biotinilação das proteínas  $\alpha$ -PCC e BCCP de *A. brasilense* pela enzima biotina ligase (BirA) de *E. coli*, permitindo assim a posterior caracterização dos complexos PII-BCCP e PII-PCC de *A. brasilense* através de ensaios de interação e atividade. Após a purificação da proteína BCCP e das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da PCC, foram realizados ensaios de biotinilação *in vitro* para estabelecer um protocolo otimizado de biotinilação destas proteínas pela enzima BirA de *E. coli* (EcBirA). Ensaios de biotinilação *in vivo* também foram realizados através da co-expressão de  $\alpha$ -PCC e EcBirA. Os resultados obtidos mostram que fatores como concentração de EcBirA e tempo de reação são determinantes para os níveis e especificidade da biotinilação de  $\alpha$ -PCC por EcBirA *in vitro*. AbBCCP não foi biotinilada de forma eficiente sob nenhuma condição, o que pode estar associado a organização do sítio de biotinilação dessa proteína ou com sua característica de formação de oligômeros de alta massa molecular. Os dados descritos vão contribuir para futura caracterização dos complexos entre PII e as enzimas acetil-CoA-carboxilases em *A. brasilense*.

Palavras-chave: PII, acetil-CoA carboxilase, PCC

## ABSTRACT

PII protein family are known as signal transducers, being well known for their role in the regulation and coordination of nitrogen metabolism. Recently, PII proteins showed to be able to regulate enzymes related to carbon metabolism through direct interaction with the BCCP (Carboxyl Biotin Carrier Protein) subunit of the enzyme Acetyl-CoA carboxylase (ACC), which suggests that PII proteins can sensory levels of cellular carbon. The first warning of the interaction of PII with ACC in bacteria was noticed in *A. brasilense*, where a BCCP subunit was found linked to GlnZ. In addition to BCCP, another acyl-carboxylase was found as a possible PII target in *A. brasilense*, named as acetyl/propionyl-CoA carboxylase (PCC). Both BCCP and PCC are dependent on biotinylation to be functional. The role of PII proteins in the regulation of those enzymes is of very particular interest, since function of BCCP and PCC proteins in *A. brasilense* metabolism is unknown. The aim of the present work was to improve the expression, purification and biotinylation of  $\alpha$ -PCC and BCCP proteins of *A. brasilense* by the enzyme biotin ligase (BirA) of *E. coli*, thus allowing a characterization of the PII-BCCP and PII-PCC complexes of *A. brasilense* through interaction and activity assays. After purification of BCCP and PCC  $\alpha$  and  $\beta$ , *in vitro* biotinylation tests were performed, to create an optimized biotinylation protocol of those proteins by *E. coli* BirA enzyme (EcBirA). *In vivo* biotinylation assays were also performed by co-expression of  $\alpha$ -PCC and EcBirA. The results obtained show that factors such as EcBirA concentration and reaction time are determinant for the levels and specificity of  $\alpha$ -PCC biotinylation by EcBirA *in vitro*. AbBCCP was not efficiently biotinylated under the tested condition, which may be associated with the organization of BCCP biotinylation site or formation of high molecular weight oligomers by BCCP. The data obtained will contribute for the characterization of complexes between PII and the acetyl-CoA carboxylase enzymes in *A. brasilense*.

Key words: PII, acetyl-CoA carboxylase, PCC

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MODELO REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS PII.....	10
FIGURA 2: ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA POR ACC.....	13
FIGURA 3: ORGANIZAÇÃO DA ACETIL-COA CARBOXILASE NO DIFERENTES ORGANISMOS .....	15
FIGURA 4: TESTE DE DIFERENTES RESINAS PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA AbBCCP. ....	223
FIGURA 5: PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PURIFICAÇÃO DE AbBCCP NATIVA.....	23
FIGURA 6: ANÁLISE DA BIOTINILAÇÃO DE AbBCCP .....	24
FIGURA 7: PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO NA COPURIFICAÇÃO DAS SUBUNIDADES $\alpha$ E $\beta$ DE PCC .....	25
FIGURA 8: ANÁLISE DA BIOTINILAÇÃO DE $\alpha$ -PCC .....	27
FIGURA 9: CURVA DE BIOTINILAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA BirA.....	28
FIGURA 10: CURVA DE BIOTINILAÇÃO COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.....	30
FIGURA 11: PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO NA COPURIFICAÇÃO DAS SUBUNIDADES $\alpha$ E $\beta$ DE PCC .....	31
FIGURA 12: ANÁLISE DA BIOTINILAÇÃO DE $\alpha$ -PCC <i>in vivo</i> E <i>in vitro</i> .....	31
FIGURA 13: PERFIL ELETROFORÉTICO DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DE $\alpha$ -PCC À ESTREPTAVIDINA SOLÚVEL.....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	17
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Proteínas PII .....	10
1.2 Acetil-CoA Carboxilase .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 Bactérias e Plasmídeos .....	17
3.2 Condições de Cultivo .....	17
3.3 Antibióticos .....	17
3.4 Purificação de DNA plasmidial .....	18
3.5 Transformação bacteriana por choque térmico .....	18
3.6 Expressão das proteínas de interesse .....	19
3.7 Purificação das subunidades $\alpha$ e $\beta$ da proteína PCC de <i>A. brasilense</i> .....	19
3.8 Purificação da proteína AbBCCP nativa.....	20
3.9 Dosagem de proteína .....	20
3.10 Eletroforese desnaturante de proteínas .....	21
3.11 <i>Western blot</i> de proteínas biotiniladas .....	21
3.12 Ensaio de Biotinilação de $\alpha$ -PCC .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34

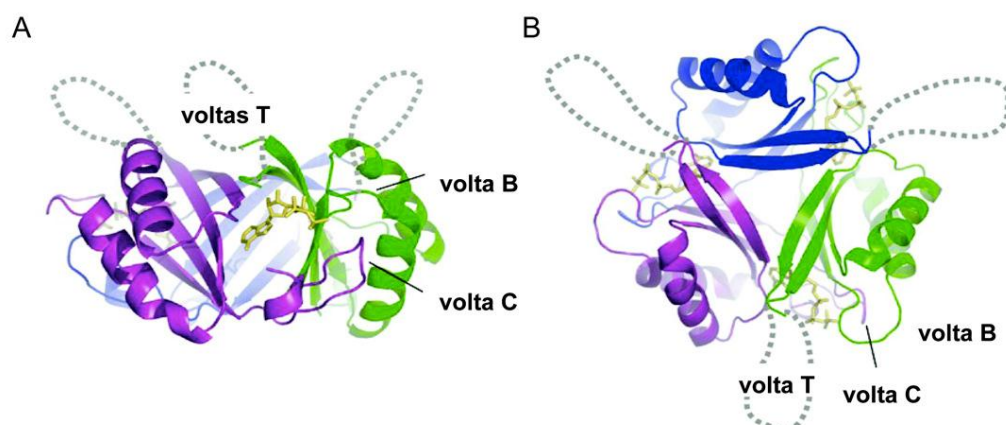
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Proteínas PII

As proteínas transdutoras de sinal da superfamília PII, presentes em todos os domínios da vida (Bacteria, Archaea fixadora de nitrogênio e cloroplastos de eucariotos autotróficos), desempenham um importante papel na regulação e coordenação de processos metabólicos centrais através da interação direta com enzimas, fatores de transcrição e proteínas de membrana (FORCHHAMMER, 2008; HUERGO *et al.*, 2013).

As proteínas PII são transdutoras dos níveis de nitrogênio, carbono e estado energético intracelular. As flutuações dos níveis desses componentes promovem alterações conformacionais nessas proteínas – através da ligação de efetores alostéricos –, e modificações covalentes. De acordo com seus estados de conformação e modificação covalente, as PII interagem com proteínas-alvo, associadas, em sua maioria, com a regulação das reações de assimilação do nitrogênio (FORCHHAMMER, 2008). Essas proteínas conservam uma estrutura muito característica, sendo constituídas por três subunidades, sendo que cada subunidade contém três estruturas em volta: *loop-T*, *loop-B* e *loop-C*. *Escherichia coli* possui duas proteínas tipo PII, GlnB e GlnK (sendo GlnK denominada GlnZ em *Azospirillum brasilense*, que também possui a proteína GlnB). Essas proteínas possuem uma estrutura tridimensional altamente conservada (FIGURA 1). São (homo) triméricas e possuem uma massa molecular de 12 a 13 kDa por monômero. Cada monômero por sua vez possui aproximadamente 112 aminoácidos (FORCHHAMMER, 2008).

FIGURA 1: MODELO REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS PII.



Representação da GlnK de *Escherichia coli* co-cristalizada com ATP: vista lateral (A) e superior (B). Cada subunidade está representada por uma cor: lilás, verde e azul, e o ATP em amarelo. As voltas denominadas B, C e T estão em destaque. Fonte: MOURE (2012), adaptado de FORCHHAMMER (2008).

Em *E. coli* as proteínas PII regulam a atividade do sistema NtrB-NtrC, controlando a transcrição de vários genes envolvidos com a regulação do metabolismo de nitrogênio (JIANG e NINFA, 1999), além de modularem a captação e assimilação de amônio por interação com AmtB e ATase, respectivamente (JAVELLE *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2007). Em cianobactérias e plantas as PII controlam a biossíntese de arginina (HEINRICH *et al.*, 2004), atuando também na regulação de fatores transcricionais relacionados ao nitrogênio através da interação com PipX e PamA em cianobactérias (FORCHHAMMER, 2008). Segundo Castellen e colaboradores (2011), em bactérias gram-negativas também ocorre a regulação de fatores transcricionais pelas PII, como em cianobactérias, por interação direta com TnrA, AmtR e GlnR. A regulação da síntese e atividade da nitrogenase (através da interação com DraG, DraT, AmtB e NifA) e o controle transcricional da fixação de nitrogênio (NifA e NifL) em diazotrofos também são funções desempenhadas pelas PII na regulação do metabolismo do nitrogênio desses organismos (SARKAR *et al.*, 2012; HUERGO *et al.*, 2013).

Em proteobactérias as proteínas tipo PII têm a capacidade de ser covalentemente modificada por uridililação no resíduo de tirosina 51 localizado no loop-T de cada monômero (HUERGO, 2006). Em Actinomycetos e em cianobactérias a modificação ocorre com adenilação da Tirosina (Tyr) 51 ou a fosforilação do resíduo Serina (Ser) 49, respectivamente (FORCHHAMMER, 2004). Em *E. coli* a cascata de interações das proteínas da família PII com seus receptores é conhecida como sistema Ntr “*nitrogen regulation system*”.

O amônio é a fonte de nitrogênio preferencial para *E. coli* e muitos outros microrganismos em condições aeróbicas, sendo assimilado em glutamina e glutamato (REITZER, 2003). Esses dois aminoácidos atuam como doadores de nitrogênio intracelular para produzir outros compostos orgânicos contendo nitrogênio através de reações de transaminação e transamidação (REITZER, 2003). Em *E. coli* e outras bactérias a síntese de glutamina ocorre através da glutamina sintetase (GS), a partir de amônio e glutamato. A síntese de glutamato, por sua vez, pode ocorrer pela via GS/GOGAT (Glutamato sintase ou Glutamina:2-oxoglutarato aminotransferase), onde

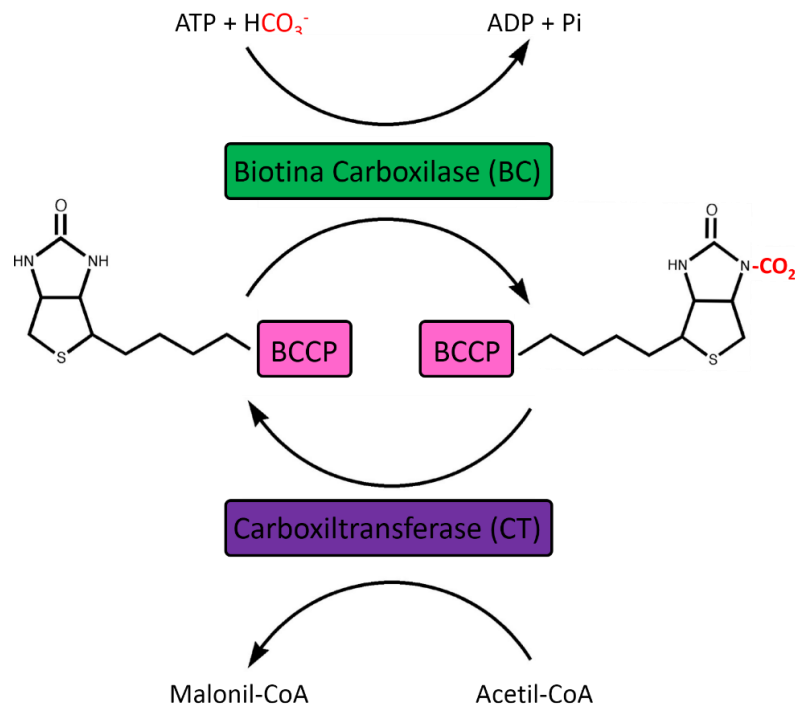
glutamina produzida por GS é combinada com 2-OG pela enzima glutamato sintase produzindo dois glutamatos, ou pela assimilação direta de amônia em 2-OG pela ação da glutamato desidrogenase (GDH), produzindo uma molécula de glutamato (HUERGO e DIXON, 2015). Portanto, o 2-OG sinaliza o estado de nitrogênio da célula por participar da sua assimilação, pelas vias GS/GOGAT e GDH. Depois de sintetizados, glutamato e glutamina darão origem a outros compostos (LEIGH; DODSWORTH, 2007). Como 2-OG serve como esqueleto carbônico para as reações de assimilação de nitrogênio, a concentração intracelular deste metabólito flutua de acordo com a disponibilidade de amônio, se estabelecendo uma correlação inversa entre a disponibilidade de amônio e a acumulação de 2-OG

Sendo o 2-OG um intermediário do ciclo do ácido cítrico e precursor para síntese de biomoléculas como aminoácidos, sua concentração pode variar de acordo com a disponibilidade de carbono (diretamente proporcional), assim como varia em resposta a disponibilidade de nitrogênio (inversamente proporcional). Recentemente foi mostrado que proteínas PII são capazes de regular enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono através da interação direta com uma das subunidades da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC), a subunidade BCCP, sugerindo que estas proteínas podem sensoriar os níveis de carbono celular.

## **1.2 Acetil-CoA Carboxilase**

Acetil-CoA carboxilase é uma enzima chave no metabolismo de lipídeos que catalisa a primeira etapa da síntese de ácidos graxos, promovendo a carboxilação de acetil-Coenzima A (acetil-CoA) a malonil-CoA em uma reação de duas etapas. Inicialmente há a adição de um grupo carboxil, proveniente do bicarbonato, à biotina ligada a BCCP com a utilização de uma molécula de ATP (reação catalisada pela subunidade BC). Na etapa seguinte ocorre a transferência do grupo carboxil ligado à biotina para a molécula de acetil-CoA, gerando malonil-CoA, que é o substrato utilizado nas etapas seguintes da síntese de ácidos graxos. Essa última etapa é catalisada pela subunidade CT, que fornece a especificidade requerida no reconhecimento do aceptor carboxil (PODKOWINKI E TWORAK, 2011; GERHARDT, 2015) (Figura 2). Essa proteína é amplamente distribuída nos domínios da vida, com exceção de Archaea (CRONAN JR.; WALDROP, 2002).

FIGURA 2: ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA POR ACC.



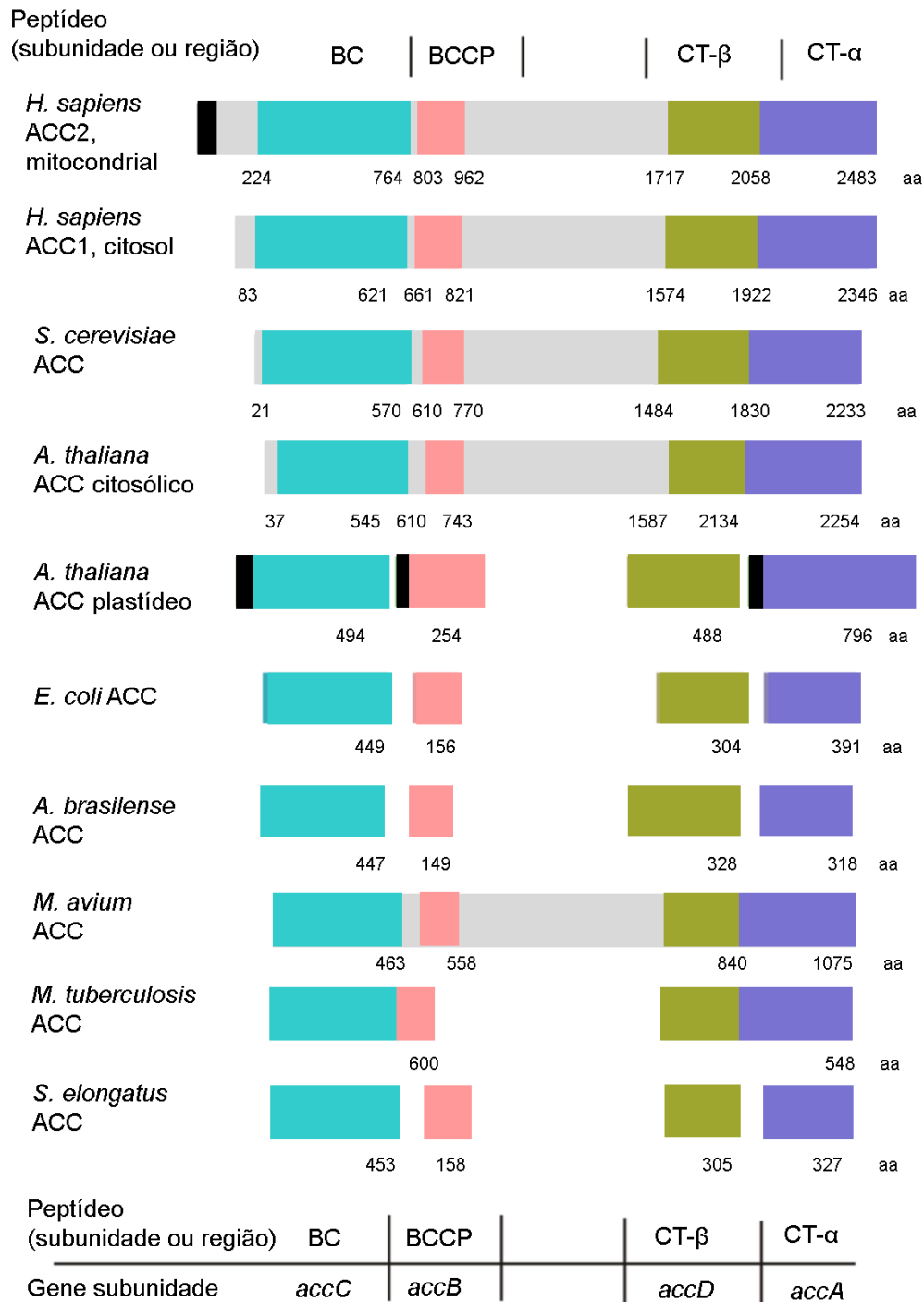
Rosa – BCCP; Verde – BC; Roxo – CT. FONTE: adaptado de CHOI-RHEE e CRONAN (2003)

Em mamíferos, fungos e plantas a proteína ACC é composta de um único polipeptídeo com três domínios funcionais. Em *E. coli* e na maioria das bactérias e no cloroplasto de plantas a enzima ACC geralmente é composta por quatro subunidades, denominadas Biotina Carboxilase (BC), Proteína Carreadora de Carboxil Biotina (BCCP) e Carboxiltransferase (dividida em duas subunidades, CT $\alpha$  e  $\beta$ ) (PODKOWINKI E TWORAK, 2011). Já em Actinobacterias como *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Rhodococcus jostii* se verifica uma organização única de ACC, apresentando várias isoformas com diferentes funções e com os domínios BCCP-BC (*accA*) e CT $\alpha$ - $\beta$  (*accD*) fusionados formando dois polipeptídeos que compõem a ACC funcional (GAGO *et al.*, 2011) (FIGURA 03). Essa divisão na forma de organização das ACCases de organismos eucarióticos e procarióticos fornece evidências de um ancestral em comum antes da separação entre Archaea e Bacteria e o surgimento de Eukaryota (LOMBARD E MOREIRA, 2011).

*A. brasilense* possui uma ACC com uma organização estrutural muito semelhante a ACC de *E. coli*, organizada em três partes catalíticas, formadas por 4 peptídeos (FIGURA 3), assim como a maioria das ACCs bacterianas. Em *A. brasilense* sp245 análises do genoma indicaram a presença de outras duas acyl-carboxilases, ambas com organização estrutural semelhante a de Actinobacteria, anotadas como

acetil/propionil-CoA carboxilase (PCC) e propionil-CoA carboxilase. PCC catalisa a reação de conversão de propionil-CoA a metilmalonil-CoA, estando envolvida com a síntese de ácidos graxos e de policetídeos em alguns organismos (DIACOVICH *et al.*, 2004). A proteína PCC geralmente apresenta atividade de ACC e ambas pouco diferem entre si, a não ser na maior afinidade de PCC para propionil-CoA do que acetil-CoA (HOU; XIANG; HAN, 2015). Segundo Diacovich e colaboradores (2004) em *S. coelicolor* essa especificidade do substrato é determinada pelo resíduo na posição 422 na subunidade  $\beta$  da enzima ACCase. Quando essa posição está ocupada por resíduos pequenos, como aspartato ou cisteína, a enzima apresentará preferência por propionil-CoA como substrato, já a ocupação por resíduos de cadeias maiores ou hidrofóbicos está associada a preferência por acetil-CoA. O alinhamento das sequências das enzimas acetil/propionil-CoA carboxilase e propionil-CoA carboxilase de *A. brasilense* com as enzimas de *S. coelicolor* e *M. tuberculosis*, indica que PCC deve apresentar preferência por acetil-CoA devido a presença de um resíduo de triptofano na posição equivalente ao resíduo 422 de *S. coelicolor* (Aspartato), enquanto que a enzima anotada como propionil-CoA carboxilase possui um aspartato nessa posição, o que sugere que sua anotação esteja correta quanto a preferência ao substrato. Embora PCC esteja anotada como acetil/propionil-CoA carboxilase em *A. brasilense* sp245, em outras estirpes de *A. brasilense* a proteína PCC está anotada como 3-metilcrotonil-CoA carboxilase, participando da via de degradação de leucina. Até o momento, a função dessas proteínas ainda não foi caracterizada, portanto, não se sabe sua importância no metabolismo de *A. brasilense*.

FIGURA 3: ORGANIZAÇÃO DA ACETIL-COA CARBOXILASE NO DIFERENTES ORGANISMOS



Em *A. brasilense* são encontradas, além da ACC semelhante a de *E. coli*, mais duas acil-carboxilases, denominadas acetil/propionil-CoA carboxilase e propionil-CoA carboxilase, com organização estrutural semelhante a ACC de *M. tuberculosis*. Cinza – Região entre os domínios de ACC monoméricas; Azul – BC; Rosa – BCCP; Verde – CT-β; Lilás – CT-α; Preto – peptídeo sinal para plastídio (*A. thaliana*) ou membrana mitocondrial (*H. sapiens*) Fonte: GERHARDT (2015), adaptado de PODKOWINSKI e TWORAK (2011).

Em *E. coli*, a subunidade BCCP (codificada pelo gene *accB* e que corresponde a uma proteína de 156 aminoácidos (17 kDa)) possui um domínio biotínico e é biotínica

*in vivo* pela proteína Biotina-ligase (EC 6.3.4.15; BirA), sendo a única proteína biotinilada em *E. coli* (CHAPMAN-SMITH; CRONAN, 1999). A biotinilação do resíduo de lisina localizado a 35 aminoácidos de distância da extremidade C-terminal (Lys 122) é essencial para que BCCP esteja ativa neste organismo. Esse reconhecimento do resíduo de lisina (K) em *E. coli* faz com que BirA seja extremamente específica na reação catalisada, havendo ainda resíduos de metionina (M) adjacentes, formando o motivo MKM, que são importantes para o reconhecimento do sítio de biotinilação por BirA (LEE *et al.*, 2008). Alguns autores verificaram que em *Myxococcus xanthus* não é encontrado o domínio MKM, mas sim MKL, no entanto, ainda assim a subunidade BCCP desse organismo é eficientemente biotinilada por EcBirA (KIMURA *et al.*, 2000). Em Actinobactérias, como *M. tuberculosis*, é observada uma organização única de ACC, onde as porções BC e BCCP compõem um único peptídeo que apresenta 2 diferentes domínios funcionais. Mesmo assim, Gago e colaboradores (2006) verificaram que a porção BCCP de MtACC possui o domínio MKM conservado e que sua organização única não interfere na eficiência da biotinilação por EcBirA. Já em *A. brasilense*, organismo foco deste estudo, não se observa uma biotinilação eficiente da subunidade BCCP por EcBirA (GERHARDT, 2015)

*A. brasilense* é um organismo diazotrófico capaz de se associar com diversas plantas de interesse econômico, tendo assim um grande potencial de uso como biofertilizante, graças a sua capacidade de colonizar as raízes de várias plantas e sua eficiência na fixação de nitrogênio *in vitro*. O fato de BCCP ter sido identificada como ligante de proteínas PII reforça o interesse no estudo deste organismo, principalmente no que diz respeito a regulação do metabolismo de carbono, uma vez que não se sabe qual a função da ACC e PCC no metabolismo de ácidos graxos em *A. brasilense*. Para tanto é necessária a obtenção das proteínas BCCP e PCC purificadas e totalmente biotinilada a fim de realizar ensaios de caracterização funcional *in vitro* e avaliação das interações com as proteínas PII.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Otimizar a expressão, purificação e biotinilação das proteínas  $\alpha$ -PCC e BCCP de *A. brasilense* pela BirA de *E. coli*.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Purificar as proteínas  $\alpha$ -PCC e BCCP de *A. brasilense*.
- Estabelecer um protocolo de biotinylation das proteínas  $\alpha$ -PCC e BCCP, comparando a biotinylation *in vivo* e *in vitro*, diferentes concentrações de BirA e diferentes tempos de reação.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Bactérias e Plasmídeos

TABELA 1 ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.

<i>Escherichia coli</i>	Características	Referência
BL21 ( $\lambda$ DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> ( $\lambda$ <i>clts</i> 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
DH10B	Sm <sup>r</sup> , F' <i>[proAB+lacZ</i> $\Delta$ <i>M15]</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plasmídeo	Características	Referência
pCY216	Cm <sup>r</sup> . Expressa <i>E. coli</i> BirA, com promotor araBAD	Chapman-Smith <i>et al.</i> , 1994
pLHAbBCCPpt	Amp <sup>r</sup> . Expressa <i>A. brasilense</i> BCCP nativa no PT7-7	Luciano F. Huergo
pLH $\alpha$ PCC28	Km <sup>r</sup> (pET28a). Expressa subunidade $\alpha$ da PCC (propionil-CoA carboxilase) de <i>A. brasilense</i>	Luciano F. Huergo
pLH $\beta$ PCC29	Km <sup>r</sup> (pET29a). Expressa subunidade $\beta$ da PCC (propionil-CoA carboxilase) de <i>A. brasilense</i>	Luciano F. Huergo

### 3.2 Condições de Cultivo

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB (SAMBROOK *et al.*, 1989), a 37°C sob agitação, sendo mantida a relação 1/5 de volume de meio para volume total do frasco. Para cultivo de *E. coli* em meio sólido foi utilizado o meio LA e as placas mantidas a 37°C

### 3.3 Antibióticos

Os antibióticos empregados e suas respectivas concentrações foram: canamicina (Km) 100 µg/mL e cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL. Os estoques dos antibióticos foram preparados como descrito por Sambrook *et al.*, 1989 e mantidas a 4°C.

### 3.4 Purificação de DNA plasmidial

A purificação de DNA plasmidial em *E. coli* DH10B foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um e meio mililitros de uma cultura de células, incubada *over night* em meio LB a 37°C, foram centrifugados a 13.000 rpm por 60 segundos (centrífuga Eppendorf MiniSpin). O *pellet* de células precipitadas foi ressuspensão em tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e as células lisadas com a adição de 1% (p/v) SDS e 0,2 M de NaOH. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com Kcaf (acetato de potássio 3 M pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L). Após incubação por 10 minutos em banho de gelo, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf MiniSpin) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), após agitação por inversão a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf MiniSpin). À fase aquosa coletada, foram adicionados 2 volumes de etanol 96% com o objetivo de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf MiniSpin) por 15 minutos e o precipitado obtido lavado com etanol 80% (v/v), centrifugado a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf MiniSpin) por 15 minutos, seco a vácuo ou em bancada e ressuspensão em água.

### 3.5 Transformação bacteriana por choque térmico

Para a transformação bacteriana foi utilizado o método de células quimiocompetentes. Foram preparadas células BL21 (λDE3) e DH10B, crescidas *over-night* em 5 mL de meio LB. No dia seguinte as culturas foram diluídas em 250 mL de meio LB (1:100 v/v) e crescidas até densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) entre 0,3 e 0,4. Em seguida as culturas foram transferidas para tubos de centrifugação de 400 mL e mantidas em gelo por 30 minutos, sendo centrifugadas logo em seguida por 10 minutos a 800 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular obtido

ressuspensão em 8 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M e mantidas em gelo por 30-60 minutos. Uma nova etapa de centrifugação foi realizada por 10 minutos a 800 x g a 4°C, sendo as células sedimentadas ressuspensas em 8 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M e glicerol 15% (solução gelada). As células foram separadas em alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e armazenadas a -80°C.

Para a transformação, as alíquotas de células foram mantidas no gelo por 30 minutos, seguido da adição do DNA plasmidial de interesse à mistura de células, mantendo-se no gelo por 30 minutos. O choque térmico foi realizado em banho-maria a 42°C por 2 minutos e novamente banho de gelo por 2 minutos, seguido da adição de 1 mL de LB. As células foram mantidas a 37°C por 40 minutos para recuperação. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados

### 3.6 Expressão das proteínas de interesse

A expressão das subunidades  $\alpha$  (BCCP+BC) e  $\beta$  (CT $\alpha$  e CT $\beta$ ) da PCC de *A. brasilense* foi realizada em células *E. coli* BL21 ( $\lambda\text{DE3}$ ) inoculadas em 400 mililitros de meio LB na proporção de 1:100 com cultura crescida *over-night*. Quando a cultura atingiu densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) entre 0,4 e 0,7 foi adicionado 0,5 mM IPTG afim de induzir a expressão a 16°C *over-night* sob agitação. O *pellet* celular foi obtido por centrifugação a 2.240 x g por 5 minutos e as células congeladas a -20°C ou imediatamente ressuspensas em tampão de sonicação. A subunidade  $\alpha$ -PCC foi expressa fusionada a uma cauda *6xHis tagg* N terminal e a subunidade  $\beta$ -PCC foi expressa na sua forma nativa. A subunidade  $\alpha$ -PCC foi também coexpressa com EcBirA (pcY216), sendo adicionado 0,5 mM de IPTG e biotina com ou sem arabinose (0,5%) (para indução pCY216 - promotor *paraBAD*).

AbBCCP nativa foi expressa sozinha ou juntamente com EcBirA em células *E. coli* BL21 ( $\lambda\text{DE3}$ ) inoculadas em 400 mililitros de meio LB na proporção de 1:100 com cultura crescida *over-night*. Quando a cultura atingiu densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) entre 0,4 e 0,7 foi adicionado 0,5 mM de IPTG ou 0,5 mM de IPTG, biotina e arabinose (0,5%). A indução ocorreu por 3 horas a 37°C sob agitação. O *pellet* celular foi obtido por centrifugação a 2.240 x g por 5 minutos e as células congeladas a -20°C ou imediatamente ressuspensas em tampão de sonicação.

### 3.7 Purificação das subunidades $\alpha$ e $\beta$ da proteína PCC de *A. brasilense*.

Para purificação de  $\alpha$ -PCC-His e  $\beta$ -PCC os *pellets* de células foram ressuspensos em 20 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e Imidazol 500 mM). As suspensões celulares foram misturadas e sonicadas no sonicador Heat System para obtenção do extrato celular e para a reconstituição da holo-PCC (alfa + beta). O sobrenadante foi obtido por centrifugação (20 minutos a 20000 x g, a 4°C) e aplicado em coluna HiTrap *Chelating* (GE healthcare) pré carregada com NiCl<sub>2</sub> e equilibrada com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e Imidazol 50 mM). Para eluição foi utilizado um gradiente de imidazol com concentrações crescentes imidazol (150, 200, 250, 300, 400, 500 e 650 mM) em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 e NaCl 100 mM. As frações obtidas foram aplicadas em gel SDS PAGE e aquelas com maior quantidade de proteínas e maior grau de pureza selecionadas e carregadas em uma coluna de *dessalting* e eluídas em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e glicerol 10% (v/v).

### 3.8 Purificação da proteína AbBCCP nativa

Para purificação de AbBCCP nativa foi utilizada a coluna Q FF de 1 mL (GE Healthcare), acoplada a bomba peristáltica. O *pellet* celular foi ressuspenso em tampão de sonicação/equilíbrio (Tris HCl 50 mM pH 7,5) e o sobrenadante obtido do extrato celular após sonicação foi carregado na coluna pré-equilibrada com tampão de sonicação/equilíbrio. A eluição das proteínas foi realizada em gradiente crescente de NaCl (50, 100, 250,350, 500, 700 e 1000 mM) em Tris HCl 50 mM pH 8,0. As frações coletadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 15% e as frações mais concentradas e com maior grau de pureza reunidas e aplicadas em coluna de gel filtração Sephacryl S200 com tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e glicerol 5% (v/v). As frações contendo a BCCP foram agrupadas, concentradas, aliquotadas e armazenadas a -20°C.

### 3.9 Dosagem de proteína

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método Bradford (BRADFORD, 1976), segundo especificações do Reagente de Bradford (Biorad), com curva padrão de albumina bovina (BSA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, em comprimento de ondas de 595 nm.

### 3.10 Eletroforese desnaturante de proteínas

Eletroforese de proteínas, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), foram realizadas em gel de poliacrilamida de 10 a 15%, como descrito por LAEMMLI (1970). As soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito por Huergo (2006).

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical, de acordo com recomendações do fabricante (Biorad), em tampão de corrida 1X por 50-120 minutos a 100-200 V. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue ou transferido para membranas por *western blot*, dependendo do ensaio.

### 3.11 *Western blot* de proteínas biotinizadas

Após a eletroforese desnaturante, o gel foi equilibrado em tampão cátodo (C – 0,025 M Tris pH 10; 20% metanol; 0,04M ácido caprótico) e transferido para a membrana de PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare) previamente ativada em metanol, lavada em água destilada e equilibrada em solução A2 (0,025 M Tris pH 10; 20% metanol). O sistema de transferência foi montado num aparato semi-seco, sendo a placa do ânodo inicialmente coberta com 4 camadas de papel filtro previamente imersos em solução A1 (0,3 M Tris pH 10; 20% metanol). Duas camadas de papel filtro contendo solução A2 foram colocados no sistema, seguidos da membrana de PVDF previamente imersa na solução A2. O gel foi depositado sobre a membrana, após ser imerso em solução C, seguindo de seis camadas de papel filtro contendo solução C. A transferência ocorreu a 80 mA por 1 hora e 20 minutos.

Após transferência a membrana foi bloqueada com TBS-T + Tween 20 (0,3%) por 40 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com TBS-T + Tween 20 (0,05%) e estreptavidina-HRP (Sigma) por 40 minutos. Após três lavagens de 5 minutos com TBS-T, a membrana foi revelada utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados fotograficamente, utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

### 3.12 Ensaio de Biotinilação de $\alpha$ -PCC

Para determinação da melhor condição de biotinilação da proteína PCC foram feitas curvas com diferentes concentrações de BirA (0 a 1000 nM) e diferentes tempos

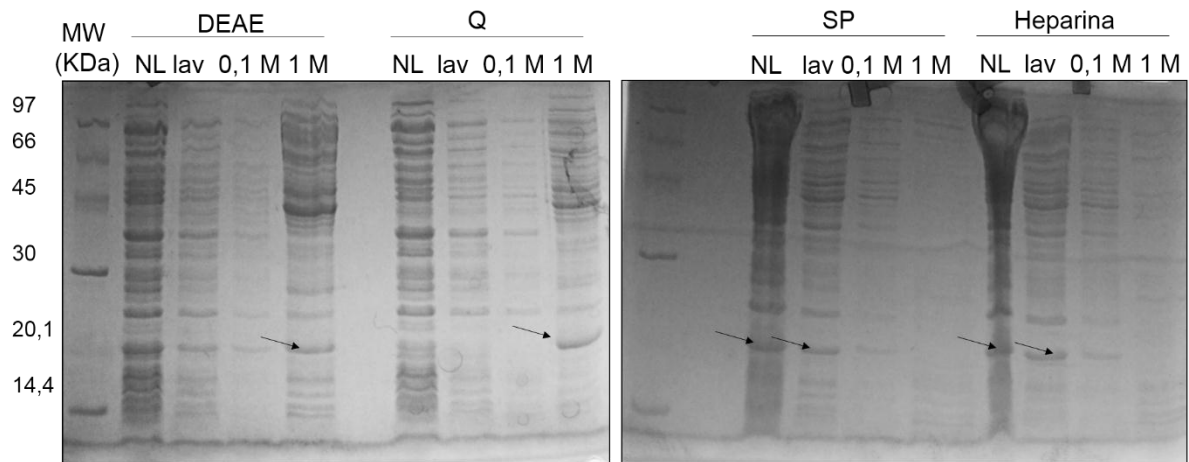
de reação (0 a 180 min) em tampão Tris HCl 40 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, ATP 3 mM, biotina 0,5 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM a 25°C. A biotilação foi verificada por *western blot*. As proteínas biotiniladas foram detectadas usando Estreptavidina-HPR e revelação com kit de quimiluminescência ECL plus (GE Healthcare). As imagens foram registradas em equipamento UVP.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O papel das proteínas PII na regulação da proteína ACC (chave no metabolismo de ácidos graxos) abriu uma gama de possibilidades sobre a função de PII na regulação do metabolismo microbiano. O primeiro indício da interação de PII em ACC em bactérias foi observado em *A. brasilense*, em ensaios utilizando GlnZ e extrato de *A. brasilense*, onde a subunidade BCCP foi encontrada ligada à GlnZ (GERHARDT, 2015). Embora diversas tentativas de caracterizar dessa interação tenham sido realizadas, nenhum avanço foi obtido na caracterização do complexo PII-ACC em *A. brasilense*, razão pela qual o complexo foi inicialmente caracterizado em *E. coli* (RODRIGUES *et al.*, 2014; GERHARDT *et al.*, 2015). A dificuldade em caracterizar o complexo em *A. brasilense* ocorreu por duas razões principais: dificuldade de purificar a proteínas BCCP sem His-tag (uma vez que a presença da cauda His interfere na formação do complexo) e a dificuldade na obtenção dessa proteína biotinilada.

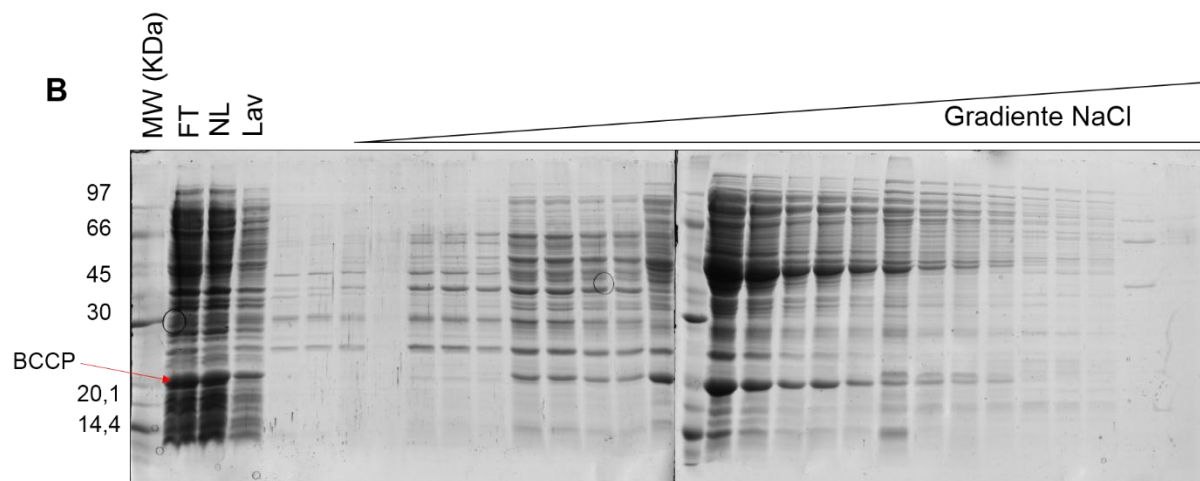
Na tentativa de otimizar a purificação de AbBCCP nativa foram testadas diferentes resinas de troca iônica, sem que a proteína se ligasse com grande afinidade a nenhuma das resinas testadas (FIGURA 4). A resina Q FF foi a matriz a qual AbBCCP se ligou com maior afinidade, sendo a resina selecionada para a purificação desta proteína (GERHARDT, 2015) (FIGURA 5). Entretanto, AbBCCP se ligou apenas parcialmente à coluna Q FF (grande parte do *pool* de proteínas permaneceu na fração não ligada) além de ter sido eluída juntamente com outras proteínas que se mostraram mais enriquecidas, até mesmo a gel filtração dessas frações não foi eficiente em separar AbBCCP das demais proteínas (dados não mostrados). Porém, embora não tenhamos obtido uma fração com alta pureza, obtivemos uma fração enriquecida em AbBCCP, com a qual optamos por realizar as análises posteriores antes de otimizar a purificação.

FIGURA 4: TESTE DE DIFERENTES RESINAS PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA AbBCCP.



Foram utilizadas as resinas DEAE sepharose, Q sepharose, SP sepharose e Heparina sepharose. A eluição das proteínas foi feita com tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 e 0,1 ou 1M de KCl (A). Eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante (SDS-PAGE) 12,5%. As setas indicam a proteína AbBCCP. MW- mascador de massa molecular; NL – fração não ligada; lav – lavagem (Tris HCl 50 mM pH 7,5; 0,1 M e 1M). Fonte: adaptado de GERHARDT (2015).

FIGURA 5: PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PURIFICAÇÃO DE AbBCCP NATIVA



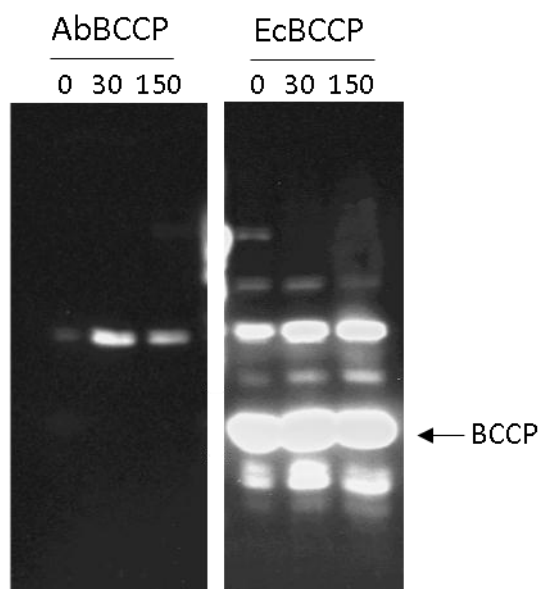
AbBCCP foi purificada utilizando a coluna Q sepharose, com eluição com gradiente de 0 a 500 mM de NaCl. Eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante (SDS-PAGE) 12,5%. MW- mascador de massa molecular; NL – fração não ligada; lav – lavagem. Fonte: adaptado de GERHARDT (2015).

Uma vez obtida AbBCCP parcialmente purificada, foram realizados ensaios de biotilação, modificação pós-traducional necessária para que BCCP esteja ativa. AbBCCP foi biotilada *in vitro*, utilizando EcBirA (2  $\mu$ M) durante 3 horas a 37°C. Porém

a biotinação não foi eficiente, não tendo sido observada biotinação quando analisado por *western blot* (FIGURA 6).

A escolha de EcBirA ocorreu em função da facilidade de obtenção dessa proteína e por já a utilizarmos em nosso laboratório. Além disso, essa enzima tem sido eficientemente utilizada para biotinar a BCCP de diferentes organismos. O sítio de biotinação de BCCP é bem conservado e em geral é formado por um motivo MKM (metionina-lisina-metionina), como em *E. coli* e *M. tuberculosis*. AbBCCP apresenta um motivo MKV e não MKM, sendo a posição da segunda metionina ocupada por uma valina (V). A substituição de M por V talvez explique a ausência de biotinação de AbBCCP por EcBirA. É possível ainda que a ausência de biotinação de AbBCCP seja explicada pelo fato da BCCP, em geral, formar oligômeros de alta massa molecular, característica já descrita para EcBCCP. Em *E. coli* isso não interfere na biotinação, porém pode apresentar alguma influência na eficiência da biotinação de AbBCCP por BirA. Como alternativa, foi testada a biotinação *in vivo*, coexpressando BirA e AbBCCP, porém também sem sucesso (dados não mostrados).

FIGURA 6: ANÁLISE DA BIOTINAÇÃO DE AbBCCP



A biotinação de AbBCCP foi avaliada por western blot. A membrana foi incubada com estreptavidina-HPR (Sigma) e revelada com ECL, seguindo as recomendações do fabricante. No gel para transferência foram adicionados 12  $\mu$ g de cada proteína em três diferentes tempos de incubação (0, 30 e 150 minutos). EcBCCP foi utilizada como controle. Na altura onde deveria aparecer AbBCCP não se observa nada, enquanto que em EcBCCP a biotinação foi bem sucedida.

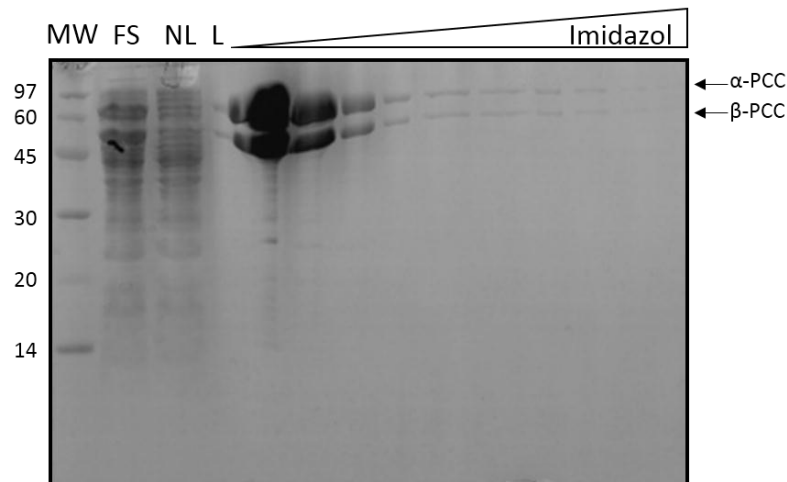
Além de BCCP, nos ensaios de interação de Gerhardt (2015), foi identificada uma outra acil-CoA-carboxilase, anotada como provável acetil/propionil-CoA

carboxilase (PCC). Frente as dificuldades encontradas na otimização da biotinylação de AbBCCP, optou-se por focar os esforços na otimização da biotinylação da subunidade  $\alpha$  da PCC de *A. brasilense*. Os genes para essa enzima foram clonados em nosso laboratório e as proteínas foram purificadas de forma eficiente.

As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da enzima PCC foram expressas a partir dos plasmídeos pET28a e pET29a, respectivamente. A primeira foi expressa com cauda 6xHis na região N-terminal, sendo utilizada a coluna HiTraP *Chelating* (GE Healthcare) para sua purificação. Para  $\beta$ -PCC já haviam sido feitos testes preliminares com diversas colunas de troca iônica, porém  $\beta$ - PCC não se ligou a nenhuma das matrizes testadas. Portanto, optou-se pela copurificação de  $\beta$ - PCC, utilizando  $\alpha$ -PCC-his imobilizada. Essa alternativa se mostrou eficiente, permitindo a purificação de  $\beta$ - PCC numa proporção de 1:1 com  $\alpha$ - PCC.

A proteína PCC obtida nessa primeira purificação foi testada em ensaios enzimáticos (acoplados e radioativos) nos quais foi verificado que a enzima é funcional, embora com baixa atividade, e que apresenta preferência pelo substrato metilcrotonil-CoA (GERHARDT e HUERGO, comunicação pessoal), sugerindo que a anotação da enzima está incorreta em *A. brasilense* sp245. Entretanto esses dados ainda são preliminares e precisam ser mais aprofundados. Devido à baixa atividade observada, optamos por testar uma estratégia diferente na purificação para testar se isso interferia na atividade da enzima. A enzima metilcrotonil-CoA carboxilase (MCC) de *Xanthomonas* só apresenta atividade quando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são coexpressas ou então seus extratos lisados juntos, devido à instabilidade da subunidade  $\alpha$  quando purificada sozinha (DIACOVICH, comunicação pessoal). Uma análise de BLAST indicou alta similaridade entre a proteínas PCC de *A. brasilense* com MCC de *Xanthomonas*. Por essa razão optamos por purificar as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  misturando os extratos proteicos antes da lise por sonicação. Essa estratégia se mostrou eficiente para a purificação de ambas subunidades. (FIGURA 7).

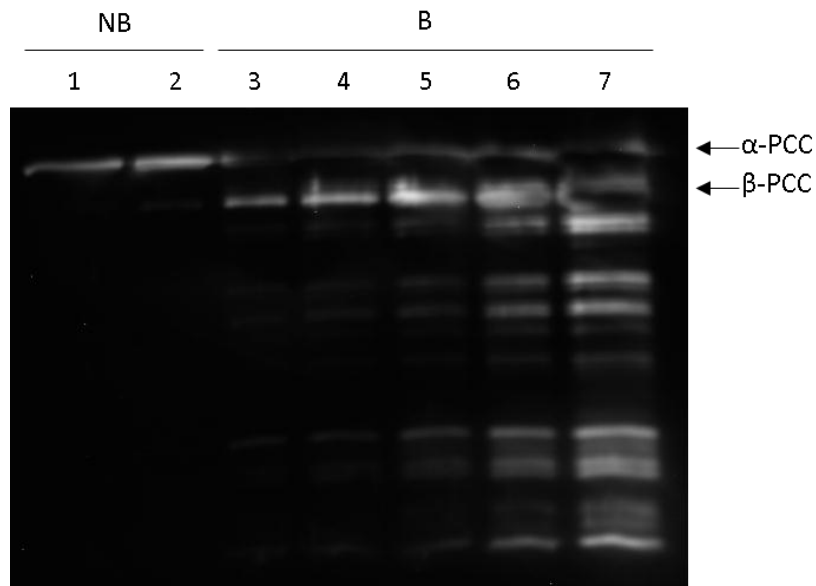
FIGURA 7: PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO NA COPURIFICAÇÃO DAS SUBUNIDADES  $\alpha$  E  $\beta$  DE PCC



A eluição das proteínas ligadas a coluna HiTraP *Chelating* foi feita em gradiente de imidazol. As frações obtidas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com azul de *Comassie*. MW – marcador de massa molecular, kDa; FS – Fração Solúvel; NL – Não Ligado; L – Lavagem.

A eluição de  $\alpha\beta$ -PCC se deu logo nas primeiras frações coletadas, em gradiente de 10 a 15% de tampão B (Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e Imidazol 1 M). Uma vez purificadas as proteínas foram quantificadas, com concentração obtida de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Para um primeiro ensaio de biotilação de  $\alpha$ -PCC foram utilizadas as proteínas obtidas da co-purificação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de PCC (FIGURA 08). A reação de biotilação *in vitro* foi montada com 40 mM Tris HCl pH 8,0, 3 mM ATP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  de Biotina, 100 mM NaCl, 2 mM DTT e 1  $\mu\text{M}$  de BirA, para uma reação de 15 mL, por 3 horas a 25°C. A biotilação foi verificada por *western blotting* (FIGURA 8). Embora a biotilação tenha ocorrido, verificamos que houve muita biotilação inespecífica tanto da subunidade  $\beta$  quanto dos contaminantes presentes na amostra.

FIGURA 8: ANÁLISE DA BIOTINILAÇÃO DE  $\alpha$ -PCC

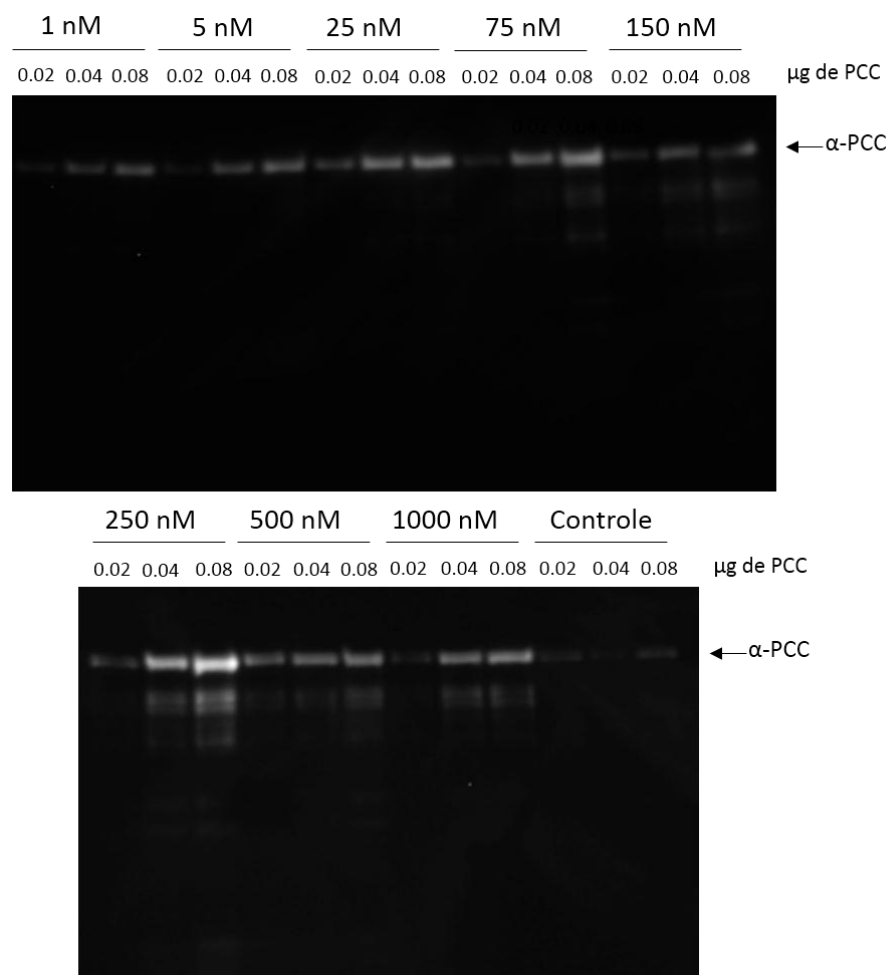
A biotinylação de  $\alpha$ -PCC foi avaliada por western blot. A membrana foi incubada com estreptavidina-HPR (Sigma) e revelada com ECL, seguindo as recomendações do fabricante. NB corresponde às frações não biotiniladas, onde foram aplicadas 0,5 e 1  $\mu$ g de AbPCC, linhas 1 e 2, respectivamente. Para as frações biotiniladas (B) foram aplicados no gel 0,25, 0,5, 1, 2 e 5  $\mu$ g de AbPCC, linhas 3 a 7. A primeira de cada linha do gel (indicada pela seta) corresponde a subunidade  $\alpha$ -PCC.

Na FIGURA 8 podemos observar que nas frações correspondentes ao ensaio de biotinylação (linhas 3 a 7) EcBirA apresentou atividade de biotinylação inespecífica, biotinilando não só a subunidade  $\alpha$ -PCC mas também a subunidade  $\beta$ -PCC (indicada pela seta) e outras proteínas que estavam na reação. EcBirA é uma ligase de biotina que apresenta excepcional especificidade *in vivo*, uma vez que em *E. coli* realiza a biotinylação de uma única proteína, a subunidade BCCP da acetil-CoA-carboxilase (CHAPMAN-SMITH e CRONAN, 1999). Cronan e colaboradores (2004) testaram a especificidade da BirA selvagem em comparação com mutantes da mesma proteína de *E. coli*. O que eles observaram foi que os mutantes apresentam atividade protéica promíscua, atribuindo essa característica a condição de acilação química por bio-5-AMP liberado a partir do sítio ativo mutante ou devido ao fato das cadeias laterais de lisina das outras proteínas estarem ganhando acesso ao sítio ativo da BirA mutante, uma vez que o resíduo de lisina alvo das proteínas biotiniladas parece ser extraordinariamente acessível.

Devido à alta quantidade de proteínas biotiniladas inespecificamente, e uma vez que a EcBirA por nós utilizada nos ensaios é do tipo selvagem, o que deveria fazer com que a reação fosse específica como observado *in vivo*, houve a necessidade de

se estabelecer um protocolo para otimizar a biotilação *in vitro* da subunidade  $\alpha$ -PCC pela BirA de *E. coli*. Inicialmente foram testadas diferentes concentrações de proteína BirA em reações de 200  $\mu$ L (40 mM Tris HCl pH 8,0, 3 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M de Biotina, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) e 160  $\mu$ g de holo-PCC ( $\alpha + \beta$ ). Para cada reação foram adicionadas concentrações diferentes de EcBirA (1, 5, 25, 75, 150, 250, 500 e 1000 nM). Ao tubo controle, não foi adicionado EcBirA (FIGURA 9).

FIGURA 9: CURVA DE BIOTILAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA BirA



A biotilação de  $\alpha$ -PCC foi avaliada por western blot. A membrana foi incubada com estreptavidina-HPR (Sigma) e revelada com ECL seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação com diferentes concentrações de EcBirA foram adicionados 160  $\mu$ g de AbPCC. No gel para transferência foram aplicados 0,02, 0,04 e 0,08  $\mu$ g de AbPCC biotinizadas de cada uma das reações. Nas frações correspondentes ao controle não foi adicionada EcBira.

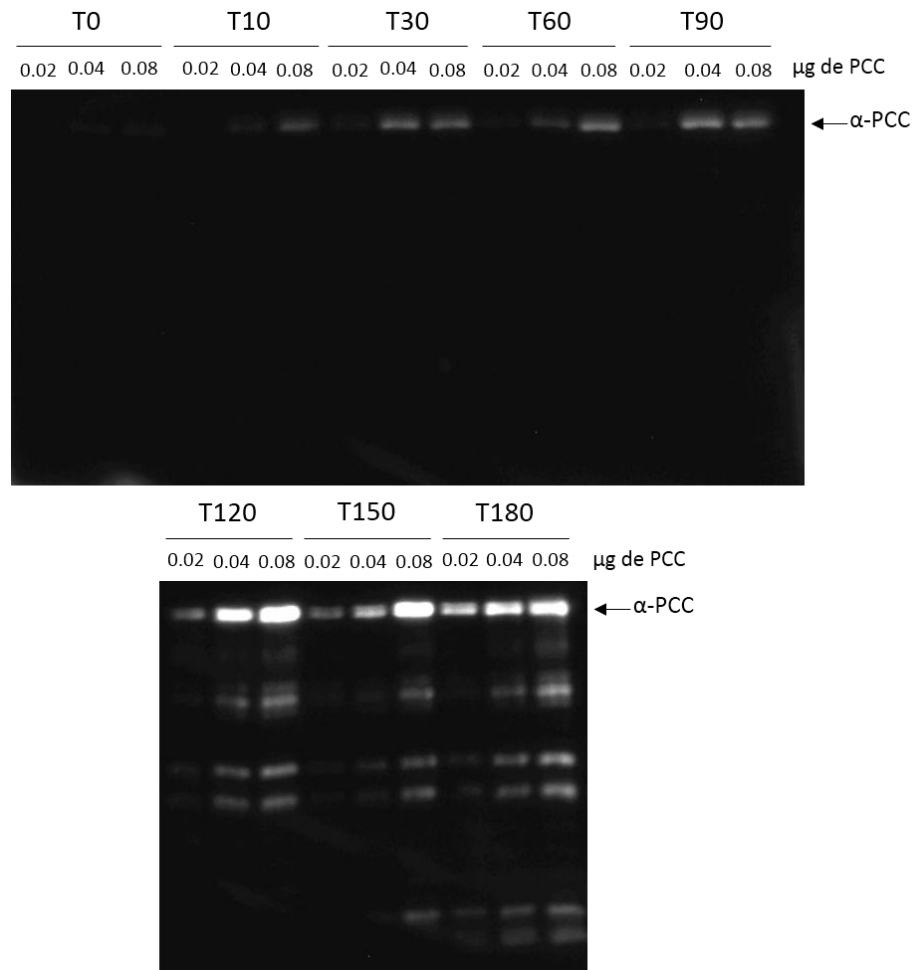
É possível observar um aumento na intensidade das bandas que correspondem a subunidade  $\alpha$ -PCC (FIGURA 9). No entanto, com o aumento da concentração de EcBirA, observa-se também o aparecimento de bandas inespecíficas,

correspondentes a outras proteínas, indicando uma atividade pouco específica de EcBirA quando em concentrações maiores que 75 nM.

As reações utilizadas para o ensaio de biotinição descrito acima foram analisadas um ensaio de ligação à resina de avidina monomérica (MagSelect SA-Sigma). Para esse teste 15  $\mu\text{L}$  de resina foram equilibrados com tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e glicerol 10%, seguido da adição de 50  $\mu\text{L}$  de cada reação de biotinição. Após incubação por 15 minutos o sobrenadante foi descartado e a resina lavada três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de tampão. Após a última lavagem foi adicionado tampão de amostra para SDS-PAGE e a amostra foi fervida por 5 minutos. Todo o conteúdo dos tubos foi aplicado em gel SDS PAGE 10% (dados não mostrados). Nessa análise a quantidade de proteína utilizada aparentemente saturou a resina, não tendo sido observada diferença entre as condições.

Com base na análise por western blot, optamos pela concentração de 25 nM de BirA para os ensaios posteriores. Foram testados diferentes tempos de incubação para verificarmos o tempo mínimo necessário à biotinição da subunidade  $\alpha$ -PCC por EcBirA. Para tanto foram montadas 8 reações de 200  $\mu\text{L}$  (40 mM Tris HCl pH 8,0, 3 mM ATP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  de Biotina, 100 mM NaCl, 1 mM DTT e 25 nM de BirA) e 160  $\mu\text{g}$  de PCC. O controle (correspondente ao T0) foi congelado imediatamente após o preparo das reações e os demais tubos foram incubados a 25°C, sendo as reações paradas em diferentes tempos (10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) (FIGURA 10). Os dados obtidos indicam que após 120 minutos a biotinição máxima de PCC já foi obtida e esse tempo foi escolhido para as demais reações de biotinição.

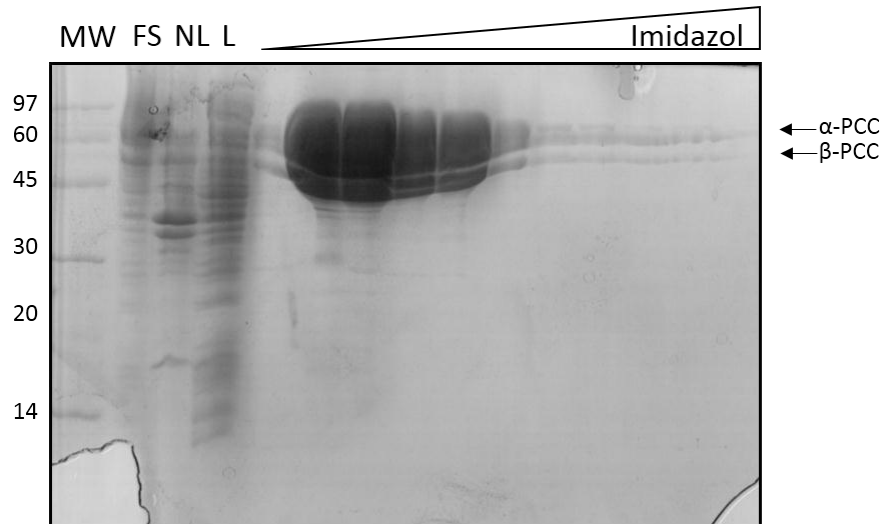
FIGURA 10: CURVA DE BIOTINILAÇÃO COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO



A biotinylation de  $\alpha$ -PCC foi avaliada por western blot. A membrana foi incubada com estreptavidina-HPR (Sigma) e revelada com ECL seguindo as recomendações do fabricante. Para cada tempo de incubação foram aplicados no gel para transferência 0,02, 0,04 e 0,08 de  $\mu$ g de AbPCC.

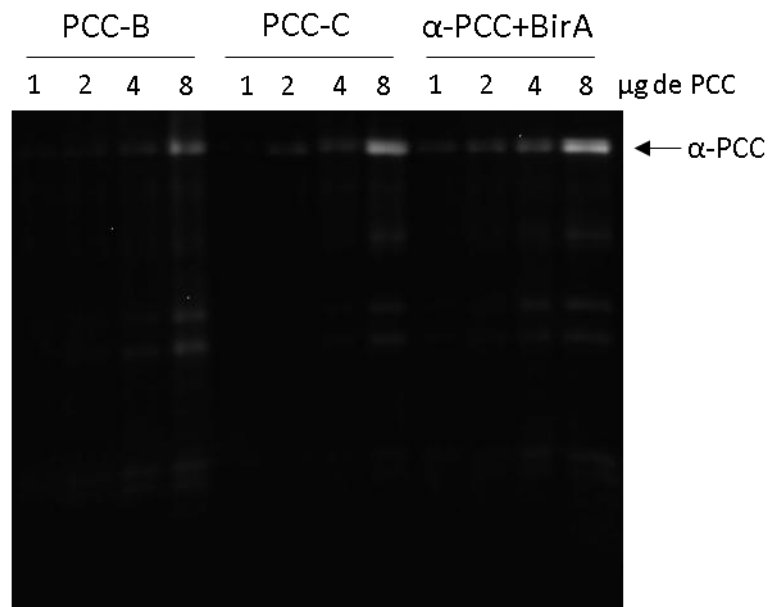
Uma vez determinada a melhor condição para biotinylation uma nova purificação de PCC foi realizada (FIGURA 11), e toda a proteína obtida foi biotinylation com 25 nM de BirA (proporção estabelecida após otimização do protocolo de biotinylation), por 2 horas a 25°C. Além disso, para compararmos a biotinylation obtida *in vivo* com a *in vitro*, a subunidade  $\alpha$  foi co-expressa com EcBirA e a biotinylation obtida foi comparada por *western blot* (FIGURA 12).

FIGURA 11: PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO NA COPURIFICAÇÃO DAS SUBUNIDADES  $\alpha$  E  $\beta$  DE PCC



A eluição das proteínas ligadas a coluna HiTraP *Chelating* foi feita em gradiente de imidazol. As frações obtidas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com azul de *Comassie*. MW – marcador de massa molecular FS – Fração Solúvel; NL – Não Ligado; L – Lavagem.

FIGURA 12: ANÁLISE DA BIOTINILAÇÃO DE  $\alpha$ -PCC *in vivo* E *in vitro*

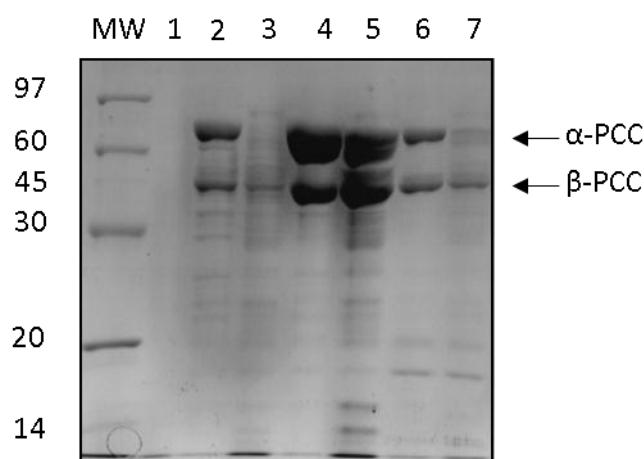


Comparação entre a biotinylation obtida *in vitro* (PCC-B) com a *in vivo* ( $\alpha$ -PCC+BirA) induzida com arabinose. PCC-C corresponde as frações do controle não biotinylation. Para cada condição foram aplicados no gel 1, 2, 4 e 8  $\mu$ g de PCC. A biotinylation de  $\alpha$ -PCC foi avaliada por *western blot*. A membrana foi incubada com estreptavidina-HPR (Sigma) e revelada com ECL seguindo as recomendações do fabricante.

Os dados obtidos indicam que a biotinylation *in vitro* foi eficiente (quatro primeiras linhas correspondentes a PCC-B, FIGURA 12), porém não foi possível comparar a biotinylation da fração biotinylation com o controle não biotinylation (quatro

linhas correspondentes a PCC-C, FIGURA 12), pois as proteínas do controle precipitaram, dificultando a homogeneização, quantificação e a utilização da quantidade correta de proteína no ensaio. Ainda na FIGURA 12 podemos observar que o sinal correspondente a biotinação *in vivo* da  $\alpha$ -PCC (últimas quatro linhas correspondentes a  $\alpha$ -PCC+BirA) é expressivo, e inclusive mais forte que o observado na biotinação *in vitro*, indicando que a co-expressão da subunidade  $\alpha$ -PCC de *A. brasilense* e EcBirA se mostrou eficiente para a biotinação de  $\alpha$ -PCC *in vivo* na presença de arabinose. Isso foi observado também através da incubação das proteínas-PCC (biotinilada e não biotinilada) com estreptavidina solúvel, que devido à alta afinidade por biotina, causa um retardamento na migração de proteínas biotiniladas, servindo como um indicativo de biotinação. Nesse ensaio, observamos o desaparecimento da banda equivalente a  $\alpha$ -PCC (obtido após biotinação *in vitro*) quando incubada com estreptavidina (linhas 2 e 3, FIGURA 13), enquanto na fração controle a banda da  $\alpha$ -PCC desapareceu apenas parcialmente (linhas 4 e 5, FIGURA 13). Essa técnica também foi utilizada para comparar as proteínas coexpressas com BirA (linhas 6 e 7, FIGURA 13), indicando que a co-expressão também foi eficiente para a biotinação de  $\alpha$ -PCC.

FIGURA 13: PERFIL ELETROFORÉTICO DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DE  $\alpha$ -PCC À ESTREPTAVIDINA SOLÚVEL



Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10%. MW – marcador de massa molecular; 1 – estreptavidina; 2 – PCC; 3 – PCC + estreptavidina; 4 – PCC-C (controle não biotinilado); 5 – PCC-C + estreptavidina; 6 – PCC coexpressa com BirA e induzida com arabinose; 7 - PCC coexpressa com BirA e induzida com arabinose + estreptavidina.

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ AbBCCP não é biotiniada de forma eficiente *in vitro* nem *in vivo* pela BirA de *E. coli*. Isso pode estar associado a ocorrência de um motivo MKV e não MKM no sítio de biotinição de AbBCCP. É possível ainda que a ausência da biotinição seja explicada pelo fato da BCCP formar oligômeros de alta massa molecular, o que pode apresentar alguma influência na eficiência da biotinição de AbBCCP por EcBirA.
- ✓ Para purificação da subunidade  $\beta$  da PCC de *A. brasilense* a alternativa de co-purificação com a subunidade  $\alpha$ -PCC-his imobilizada se mostrou eficiente, permitindo a purificação de  $\beta$ -PCC numa proporção de 1:1 com  $\alpha$ -PCC.
- ✓ O aumento da concentração de EcBirA no ensaio de biotinição *in vitro* promove o aumento da intensidade das bandas correspondentes a subunidade  $\alpha$ -PCC biotiniada, no entanto observa-se também o aparecimento de bandas inespecíficas, indicando uma atividade pouco específica de EcBirA quando em concentrações maiores que 75 nM.
- ✓ O protocolo para otimização da biotinição *in vitro* da subunidade  $\alpha$ -PCC de *A. brasilense* se mostrou eficiente, consistindo de 40 mM Tris HCl pH 8,0, 3 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M de Biotina, 100 mM NaCl, 1 mM DTT e 25 nM de BirA, numa razão de 0,1  $\mu$ g de BirA para 160  $\mu$ g de holo-PCC.
- ✓ O tempo de ideal de reação de biotinição *in vitro* para a subunidade  $\alpha$ -PCC de *A. brasilense* foi determinado em 2 horas a 25°C.
- ✓ A co-expressão da subunidade  $\alpha$ -PCC de *A. brasilense* e EcBirA se mostrou eficiente para a biotinição de  $\alpha$ -PCC *in vivo* na presença de arabinose.

## REFERÊNCIAS

- ARCONDÉGUY, T.; VAN HEESWIJK, W C; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, n. 2, p. 263–270, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p. 248-254, 1976.
- CASTELLEN, P.; REGO, F. G. M.; PORTUGAL, M. E. G.; BENELLI, E. M. The *Streptococcus* Mutans GlnR Protein Exhibits an Increased Affinity for the glnRA Operon Promoter When Bound to GlnK. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1202–1208, 2011.
- CHAPMAN-SMITH, A.; TURNER, D. L.; CRONAN, J. E.; MORRIS, T. W.; WALLACE, J. C. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. **Biochemical Journal**, v. 302, n. Pt 3, p. 881–887, 1994.
- CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN, J. E. The Enzymatic Biotinylation of Proteins: A Post-Translational Modification of Exceptional Specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 9, p. 359–363, 1999.
- CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **PNAS**, v.86, p.2172-2175, 1989.
- CHOI-RHEE, E.; CRONAN, J. E. The Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 30806–30812, 2003.
- CHOI-RHEE, E.; SCHULMAN, H; CRONAN, K. E. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. **Protein Science**, 13:3043-3050, 2004.
- CRONAN JR., J. E.; WALDROP, G. L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 5, p. 407–435, 2002.
- DIACOVICH, L.; MITCHELL, D. L.; PHAM, H.; GAGO, G.; MELGAR, M. M.; KHOSLA, C.; GRAMAJO, H.; TSAI, S.-C. Crystal Structure of the Beta-Subunit of Acyl-CoA Carboxylase: Structure-Based Engineering of Substrate Specificity. **Biochemistry**, v. 43, n. 44, p. 14027–14036, 2004.
- FORCHHAMMER, K. Global Carbon/nitrogen Control by PII Signal Transduction in Cyanobacteria: From Signals to Targets. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 319–333, 2004.

FORCHHAMMER, K. P(II) Signal Transducers: Novel Functional and Structural Insights. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, 2008.

GAGO, G.; KURTH, D.; DIACOVICH, L.; TSAI, S.-C.; GRAMAJO, H. Biochemical and Structural Characterization of an Essential Acyl Coenzyme A Carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 477–486, 2006.

GAGO, G.; DIACOVICH, L.; ARABOLAZA, A.; TSAI, S.-C.; GRAMAJO, H. Fatty Acid Biosynthesis in Actinomycetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 3, p. 475–497, 2011.

GARY P. Functional Characterization of Three GlnB Homologs in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Roles in Sensing Ammonium and Energy Status. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6159–6168, 2001.

GERHARDT, E. C. M. Identificação e estudo in vitro da interação entre proteínas PII e proteínas alvo. Curitiba, 2015. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HEINRICH, A.; MAHESWARAN, M.; RUPPERT, U.; FORCHHAMMER, K. The *Synechococcus elongatus* PII Signal Transduction Protein Controls Arginine Synthesis by Complex Formation with N-Acetyl-L-Glutamate Kinase. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1303–1314, 2004.

HOU, J.; XIANG, H.; HAN, J. Propionyl Coenzyme A (Propionyl-CoA) Carboxylase in *Haloferax mediterranei*: Indispensability for Propionyl-CoA Assimilation and Impacts on Global Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 794–804, 2015.

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. Interactions between PII Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS letters**, v. 580, n. 22, p. 5232–5236, 2006a.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; ARAUJO, M. S.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. ADP-Ribosylation of Dinitrogenase Reductase in *Azospirillum brasilense* Is Regulated by AmtB-Dependent Membrane Sequestration of DraG. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 326–337, 2006b.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins: Nitrogen Regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 251–283, 2013.

HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 79, n. 4, p. 419-435, 2015.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium Sensing in *Escherichia coli*. Role of the Ammonium Transporter AmtB and AmtB-GlnK Complex Formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530–8538, 2004.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J. Bacteriol*, 181(6):1906-11, 1999.

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, n. 45, p. 12979–12996, 2007.

KIMURA, Y.; MIYAKE, R.; TOKUMASU, Y.; SATO, M. Molecular Cloning and Characterization of Two Genes for the Biotin Carboxylase and Carboxyltransferase Subunits of Acetyl Coenzyme A Carboxylase in *Myxococcus xanthus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5462–5469, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEE, C.-K.; CHEONG, H.-K.; RYU, K.-S.; LEE, J. I.; LEE, W.; JEON, Y. H.; CHEONG, C. Biotinoyl Domain of Human Acetyl-CoA Carboxylase: Structural Insights into the Carboxyl Transfer Mechanism. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 72, n. 2, p. 613–624, 2008.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 349–377, 2007.

LOMBARD, J.; MOREIRA, D. Early evolution of the biotin-dependent carboxylase family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 232, 2011.

MOURE, V. R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, L. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. C. M.; MÜLLER-SANTOS, M.; ALMEIDA, F.; PEDROSA, F. O.; VALENTE, A. P.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F. Heat Stability of Proteobacterial PII Protein Facilitate Purification Using a Single Chromatography Step. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 83–88, 2012.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SCARDUELLI, M.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; SEEFELDT, L. C. The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.-U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROSS, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic

Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5240–5247, 2003.

PODKOWIŃSKI, J.; TWORAK, A. OPINIONS Acetyl-coenzyme A carboxylase – an attractive enzyme for biotechnology. **BioTechnologia**, v. 4, p. 321–335, 2011.

REITZER L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu Rev Microbiol** 57:155–176, 2003

RODRIGUES, T. E.; SOUZA, V. E. P.; MONTEIRO, R. A.; GERHARDT, E. C. M.; ARAÚJO, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; HUERGO, L. F. In Vitro Interaction between the Ammonium Transport Protein AmtB and Partially Uridylylated Forms of the P(II) Protein GlnZ. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 9, p. 1203–1209, 2011.

RODRIGUES, T. E.; GERHARDT, E. C. M.; OLIVEIRA, M. A.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; SOUZA, G. A.; MÜLLER-SANTOS, M.; HUERGO, L. F. Search for Novel Targets of the PII Signal Transduction Protein in Bacteria Identifies the BCCP Component of Acetyl-CoA Carboxylase as a PII Binding Partner. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 751–761, 2014.

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

SARKAR, A.; KÖHLER, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. A Novel Regulatory Role of the Rnf Complex of *Azoarcus* Sp. Strain BH72. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 408–422, 2012.