

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA APARECIDA GONÇALVES

A PROTEÍNA DE SINALIZAÇÃO GlnK ATUA COMO UMA SUBUNIDADE
REGULATÓRIA DISSOCIÁVEL DA ENZIMA UmpH DE *Escherichia coli*

MATINHOS

2024

ANA CAROLINA APARECIDA GONÇALVES

A PROTEÍNA DE SINALIZAÇÃO GlnK ATUA COMO UMA SUBUNIDADE
REGULATÓRIA DISSOCIÁVEL DA ENZIMA UmpH DE *Escherichia coli*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Ambientais, Setor Litoral, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo.

MATINHOS

2024

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem os meus maiores apoiadores, e por toda luta e dedicação em prol da minha educação, e aos que vieram antes de mim, mulheres e homens pretos (as), que abriram os caminhos para que eu pudesse viver e ser livre para escolher o que eu quiser ser. *Ubuntu*.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Antônio Carlos e Maria Ana, por serem os meus maiores apoiadores, por acreditarem na educação como forma de transformação e por todo os esforços que fizeram para que eu tivesse mais oportunidades e acesso à educação. Agradeço por sempre acreditarem em mim e na minha capacidade, e por todo amor, cuidado e carinho que tive a vida toda.

Ao meu companheiro, Lucas Gabriel, agradeço por todo o apoio, paciência, carinho e compreensão durante toda a minha trajetória, até mesmo antes de entrar na universidade. Obrigada por estar presente em cada fase desafiadora, por celebrar cada conquista e por ser meu companheiro de vida. Obrigada por nunca tentar me limitar.

A minha sogra, Talita, agradeço por todo incentivo e apoio, pelos livros que me presenteou para estudar e por sempre vibrar a cada nova conquista. Agradeço também pelo apoio e todas as dicas que me deu quando decidi mudar de curso e ir para a UFPR Litoral.

A minha amiga Gabriele Costa, agradeço por todos esses anos de amizade, companheirismo e apoio. Obrigada por tornar todo o meu trajeto, desde a graduação em Ciências Biológicas onde nos conhecemos, mais leve e divertido. Obrigada por todos os momentos de conversa, troca, admiração e apoio mútuo, sou muito grata por ter você na minha vida e fazer parte da sua e ainda cultivar uma amizade onde nos enxergamos como iguais, onde podemos ser vulneráveis e nos apoiar.

A minha amiga/parceira de laboratório Thaís Alliprandini, a qual conheci durante a graduação em Ciências Ambientais, agradeço por todo o companheirismo, por todos os momentos que compartilhamos e por estar ao meu lado tanto nos momentos bons quanto nos ruins. Obrigada por ser luz, por acreditar em mim, por sempre tentar me colocar pra cima e por todos os conselhos. Você tornou minha caminhada dentro do curso e no laboratório mais feliz e engraçada. Obrigada por essa amizade onde não nos enxergamos como rivais, mas sim, como aliadas.

Ao meu orientador, professor Luciano Fernandes Huergo, agradeço por todas as oportunidades que me concedeu, por acreditar e confiar em mim, por ter sido receptivo comigo desde o começo, pela paciência, por tudo que me ensinou, por ser uma inspiração como pesquisador e professor, pela parceira e amizade, por sempre se preocupar comigo e por ter sido o melhor orientador que eu poderia ter

encontrado. Obrigada por tudo, sem você este e nenhum outro trabalho teria sido possível.

Ao professor Karl Forchhammer, agradeço por ter me aceitado em seu laboratório, por ter me recebido incrivelmente bem, por toda orientação durante o intercâmbio, por todas as ideias que deu para que este trabalho pudesse ser concluído, pelos momentos de descontração e principalmente, pela paciência, pelo apoio e por ser uma grande fonte de inspiração.

A professora Edileusa Gerhardt, agradeço por sempre ser uma pessoa maravilhosa comigo, por todo o cuidado e carinho por mim, por toda ajuda que me deu durante o intercâmbio e no dia a dia, por todos os conselhos acadêmicos/de vida que me deu e por todos os momentos que compartilhamos juntas. Obrigada pelo apoio, por vibrar com as novas conquistas e por todas as vezes que abriu sua casa para que eu pudesse ficar. Agradeço também por todas as contribuições feitas para que este trabalho pudesse ser concluído e por ser uma inspiração de professora, mulher e cientista.

Ao meu amigo de laboratório, Marcelo Conzentino, agradeço por desde o começo ter me acolhido no laboratório e por ter me ensinado praticamente tudo o que eu sei. Obrigada também pelos momentos de amizade fora do laboratório.

Aos meus amigos de laboratório Humberto e Nigella, agradeço por todos os nossos momentos juntos, dentro e fora do laboratório, por todo o apoio e carinho e por sempre torcerem por mim. Agradeço também por todas as nossas trocas.

A minha amiga Vera Chicora, agradeço por todo carinho e amor, por sempre me apoiar e por toda ajuda no laboratório. Agradeço a amizade, pelos momentos de conversas sobre a vida, pelos conselhos e pelas pausas no trabalho para tomar um cafezinho juntas. A minha formação não seria a mesma sem você.

Aos amigos de laboratório, que não estão mais presentes no momento, Vanaína, Thamyres e Lucas Raoni, agradeço por terem me ensinado muitas coisas novas, tanto acadêmicas quanto de vida, pelos momentos juntos durante o projeto dos bioaerossóis, por terem me acompanhado em diversas experiências novas e por sempre torcerem por mim.

Agradeço aos professores do curso de Ciências Ambientais, por serem extremamente qualificados e por todas as aulas incríveis e ensinamentos valiosos que me passaram.

De todos os sistemas naturais, a matéria viva é aquela que, em face das grandes transformações, preserva inscrita na sua organização a maior quantidade de história do seu próprio passado.

(EMILE ZUCKERKANDL e LINUS PAULING, 1965)

RESUMO

As proteínas da família PII são ubíquas em bactérias, arqueias e plantas e possuem a capacidade de sentir os níveis celulares de energia, carbono e nitrogênio, através da ligação de moduladores alostéricos ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG). As proteínas PII possuem a capacidade de interagir fisicamente, regulando a atividade de diversas proteínas-alvo. A bactéria *Escherichia coli* possui duas proteínas PII, sendo elas GlnK e GlnB. A enzima UMP fosfatase (UmpH) também está presente em *E. coli* e faz parte da via de degradação de nucleotídeos da classe pirimidina, removendo grupos fosfato do monofosfato de uridina (UMP). Trabalhos anteriores identificaram a enzima UmpH como possível alvo da proteína GlnK, mas até então era desconhecido o significado fisiológico da interação física entre essas proteínas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a interação entre as PII de *E. coli* e UmpH. Ensaio de *pull-down* e *Biolayer Interferometry (BLI)* confirmaram que a interação só ocorre entre UmpH e GlnK, na ausência de efector e na presença de ADP e ATP, com ADP mantendo o complexo mais estável e com maior afinidade de ligação ($K_d = 7.8 \text{ nM}$). A interação é interrompida na presença de ATP e 2-OG combinados ou quando GlnK se encontra na sua forma modificada por uridililação. Ensaio de atividade enzimática de UmpH evidenciaram que GlnK age como um inibidor de UmpH, diminuindo a atividade enzimática em até 50%, aumentando o K_m de UMP em 2,3x e diminuindo a velocidade máxima de reação em torno de 30%. Esta inibição é dose-dependente, quanto maior a concentração de GlnK maior foi a inibição de UmpH, até atingir uma saturação. O efeito inibitório de GlnK só é observado nas condições em que foi detectada a formação do complexo UmpH-GlnK, sem efector ou na presença de ADP/ATP. Através do alinhamento de sequências com PII ortólogas de *Azospirillum brasilense*, verificamos a existência de 11 resíduos únicos em GlnB de *E. coli* que estão na superfície e se concentram na cadeia lateral da proteína. Esses resíduos podem ser críticos na interação e formação do complexo UmpH-GlnK. Além disso, ensaios de *pull-down* com PII ΔloopT de *A. brasilense* mostraram que o loop-T não aparenta ser necessário para a interação de UmpH. O complexo GlnK-UmpH parece ocorrer em uma situação de alta disponibilidade de nitrogênio na célula, quando os níveis de nitrogênio aumentam e os níveis de 2-OG caem rapidamente, para a adequação do estado celular catabólico para o anabólico. Com esses resultados, temos a primeira confirmação da regulação da proteína GlnK sob a atividade enzimática de UmpH e seu envolvimento na adequação do metabolismo, apoiando estudos anteriores do seu papel central de PII na coordenação de diferentes vias metabólicas.

Palavras-chave: Proteínas PII; UmpH; GlnK; metabolismo bacteriano; regulador alostérico.

ABSTRACT

PII family proteins are ubiquitous in bacteria, archaea and plants and have the ability to sense cellular energy, carbon and nitrogen levels by binding allosteric modulators ATP, ADP and 2-oxoglutarate (2-OG). PII proteins have the ability to physically interact, regulating the activity of various target proteins. The bacterium *Escherichia coli* has two PII proteins, GlnK and GlnB. The enzyme UMP phosphatase (UmpH) is also present in *E. coli* and is part of the pyrimidine class nucleotide degradation pathway, removing phosphate groups from uridine monophosphate (UMP). Previous work has identified the UmpH enzyme as a possible target of the GlnK protein, but until then the physiological significance of the physical interaction between these proteins was unknown. This work aimed to characterize the interaction between *E. coli* PII and UmpH. *Pull-down* and *Biolayer Interferometry (BLI)* assays confirmed that the interaction only occurs between UmpH and GlnK, in the absence of effector and in the presence of ADP and ATP, with ADP maintaining the most stable complex and with the highest binding affinity ($K_d = 7.8$ nM). The interaction is interrupted in the presence of combined ATP and 2-OG or when GlnK is in its uridylation-modified form. UmpH enzyme activity assays showed that GlnK acts as an UmpH inhibitor, decreasing enzyme activity by up to 50%, increasing the K_m of UMP by 2.3x and decreasing the maximum reaction speed by around 30%. This inhibition is dose-dependent; the higher the concentration of GlnK, the greater the inhibition of UmpH, until saturation is reached. The inhibitory effect of GlnK was only observed under conditions in which the formation of the UmpH-GlnK complex was detected, without an effector or in the presence of ADP/ATP. By aligning sequences with orthologous PII from *Azospirillum brasilense*, we verified the existence of 11 unique residues in GlnB from *E. coli* that are on the surface and are concentrated in the side chain of the protein. These residues may be critical in the interaction and formation of the UmpH-GlnK complex. In addition, *pull-down* assays with PII Δ loopT from *A. brasilense* showed that the T-loop does not appear to be necessary for UmpH interaction. The GlnK-UmpH complex seems to occur in a situation of high nitrogen availability in the cell, when nitrogen levels rise and 2-OG levels fall rapidly, in order to adjust the cell's catabolic state to an anabolic one. With these results, we have the first confirmation of the regulation of the GlnK protein under the enzymatic activity of UmpH and its involvement in the adjustment of metabolism, supporting previous studies of its central PII role in the coordination of different metabolic pathways.

Keywords: PII proteins; UmpH; GlnK; bacterial metabolism; allosteric regulator.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS PII DE <i>Escherichia coli</i>	17
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA LIGAÇÃO ENTRE PII E SEUS EFETORES	18
FIGURA 3 – SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE GlnK E GlnB DE <i>Escherichia coli</i>	20
FIGURA 4 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UmpH.....	23
FIGURA 5 – VIA BIOSINTÉTICA DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIMIDINA EM <i>Escherichia coli</i>	24
FIGURA 6 – METABOLISMO DE TRANSBORDAMENTO	26

FIGURAS DO ARTIGO

FIGURE 1 – LIGAND FISHING ANALYSIS	33
FIGURE 2 – IN VITRO COMPLEX FORMATION BETWEEN UmpH AND PII.....	35
FIGURE 3 – BIOLAYER INTERFEROMETRY (BLI) ASSAYS OF THE UmpH GlnK COMPLEX.....	37
FIGURE 4 – IN VITRO ACTIVITY OF UmpH	38
FIGURE 5 – INHIBITION OF UmpH ENZYMATIC ACTIVITY BY GlnK	39
FIGURE 6 – REGULATORY MODEL OF UmpH ACTIVITY BY GlnK.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivo geral	12
1.2.2	Objetivos específicos.....	12
1.3	JUSTIFICATIVA.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	PROTEÍNAS PII.....	16
2.2	PROTEÍNAS PII E SEUS EFETORES	18
2.3	PROTEÍNAS PII DE <i>Escherichia coli</i>	19
2.4	UMP FOSFATASE (UmpH).....	22
2.4.1	Via <i>de novo</i> de biossíntese de pirimidinas.....	24
2.4.2	Função de UmpH.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	PII LIGAND FISHING AFFINITY CHROMATOGRAPHY.....	27
3.2	IN GEL PROTEIN DIGESTION AND MASS SPECTROMETRY ANALYSIS.....	28
3.3	LABEL FREE LC/MS/MS PROTEOMICS.....	28
3.4	PLASMIDS USED FOR PROTEIN EXPRESSION.....	29
3.5	PROTEIN PURIFICATION	30
3.6	IN VITRO PROTEIN COMPLEX ANALYSIS	31
3.7	UMPH PHOSPHATASE ACTIVITY ASSAYS.....	31
3.8	BIO-LAYER INTERFEROMETRY ASSAYS	32
4	RESULTADOS.....	32
4.1	IDENTIFICATION OF UMPH AS NOVEL GLNK INTERACTING PARTNER IN <i>E. coli</i>	32
4.2	CHARACTERIZATION OF THE UMPH-GLNK COMPLEX	34
4.3	GLNK INHIBITS THE PHOSPHATASE ACTIVITY OF UMPH	37
5	DISCUSSÃO	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7	MEMORIAL DAS ICHS E DO PA	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO 1 – INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR	54

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos de vida livre estão constantemente sendo desafiados em relação a disposição de nutrientes e de ambientes inóspitos, necessitando de mecanismos de adaptação que possam agir rápido e que sejam bem regulados (Chubukov *et al.*, 2014). As proteínas da família PII já estão bem descritas como transdutoras de sinal e desempenham um papel central em vários processos metabólicos, podendo ser encontradas em diferentes organismos, como bactérias, arqueias e plantas (Forchhammer, 2008). As proteínas PII são capazes de detectar o estado de energia da célula (através da relação entre ADP:ATP), dos níveis de nitrogênio (através da L-glutamina) e dos níveis de carbono (através de 2-oxoglutarato (2-OG)) (Huergo; Chandra; Merrick, 2013). Algumas combinações de interação são possíveis, incluindo ADP, ATP, ATP + Mg²⁺ (Mg.ATP) e Mg²⁺ + ATP + 2-OG (ATP. 2OG.Mg) (Merrick, 2015).

As proteínas PII conseguem interagir e regular a atividade de diversos alvos através da interação proteína-proteína e demonstram ter um papel central em diferentes vias metabólicas, como a de degradação de nitrogênio, biossíntese de NAD⁺, produção de ácidos graxos e regulação dos níveis de c-di-GMP (Ninfa; Jiang, 2005; Schubert *et al.*, 2020; Rodionova *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2018; Gerhardt *et al.*, 2015; Gerhardt *et al.*, 2020). A interação física entre PII e suas proteínas-alvo é regulada pelas mudanças estruturais induzidas na estrutura de PII após a ligação ou dissociação dos efetores alostéricos (ATP, ADP e 2-OG) e pela uridililação reversível, uma mudança pós-traducional (Truan *et al.*, 2010; Maier *et al.*, 2011; Fokina *et al.*, 2010; Merrick, 2015; Xu *et al.*, 1998).

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) tem duas proteínas PII, GlnB (produto do gene *glnB*) e GlnK (produto do gene *glnK*) (Ninfa; Jiang, 2005). GlnB e a GlnK compartilham 67% dos aminoácidos e são muito semelhantes estruturalmente (Van Heeswijk *et al.*, 1995). GlnB controla a expressão de genes regulados pelos níveis de nitrogênio por meio dos alvos NtrB e GlnE, no qual controla a atividade da glutamina sintetase (GS) (Jiang, *et al.* 2007; Forchhammer, 2008). GlnK tem uma vizinhança genômica com o gene *amtB*, que codifica um transportador de amônio, e sua função está relacionada a esse transportador, já tendo sido demonstrado que a GlnK pode se ligar a ele e inibir sua atividade (Javelle; Merrick, 2005; Javelle *et al.* 2004; Coutts *et al.* 2002; Forchhammer, 2008). Já foi sugerido que a GlnB

desempenha o papel principal na regulação dos genes Ntr, que formam o sistema central de regulação de nitrogênio, em altos níveis de nitrogênio, enquanto a GlnK evita a expressão descontrolada desses mesmos genes durante a privação de nitrogênio (Blauwkamp; Ninfa, 2002).

Através de ensaios de *ligand fishing* com as proteínas PII de *E. coli*, previamente realizados pela aluna Tatiana de Mello Damasco Nunes durante sua Iniciação Científica, sob orientação dos professores Luciano Fernandes Huergo e Gustavo Antônio de Souza, foram descobertos em torno de 100 alvos para as proteínas GlnK e GlnB, entre eles, alguns alvos já conhecidos, como as proteínas GlnD e GlnE (GONÇALVES *et al.*, 2024). Um dos novos alvos encontrados, foi a enzima UMP fosfatase (UmpH) de *E. coli*, que demonstrou interação com GlnK, se tornando um possível alvo de PII (GONÇALVES *et al.*, 2024). UmpH (anteriormente chamada de NagD) possui atividade fosfatase e faz parte da superfamília de proteínas dehalogenases (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). A sua função está relacionada com a via *de novo* de degradação de nucleotídeos do tipo pirimidina, no qual desvia o excesso de um dos intermediários da via para manter a homeostase (Reaves *et al.*, 2013). Com isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a interação entre as proteínas PII de *E. coli* e UmpH, a fim de entender em que situação a interação estaria acontecendo e se PII estaria atuando como regulador enzimático de UmpH.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Caracterizar a interação entre as proteínas PII e UmpH de *Escherichia coli*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar as proteínas His-GlnK, His-GlnB e UmpH nativa.
- Checar a interação de His-PII e UmpH nativa na ausência e na presença dos efetores de PII: ADP, ATP e 2-OG.
- Checar a interação de UmpH com PII uridililadas (PII-UMP₃).

- Conferir a atividade enzimática de UmpH na presença de diferentes substratos.
- Estabelecer a constante de Michaelis-Menten e a velocidade máxima de UmpH para o substrato monofosfato de uridina (UMP).
- Verificar se GlnK altera a atividade enzimática de UmpH.
- Avaliar os possíveis resíduos envolvidos na interação do complexo proteico.

1.3 JUSTIFICATIVA

Este estudo pretende elucidar como ocorre e qual o propósito da interação entre as proteínas PII e sua proteína-alvo UmpH. Já foi relatado anteriormente que as proteínas PII evoluíram para ter um papel central no metabolismo, sentindo o estado celular e regulando diversos alvos envolvidos no metabolismo do nitrogênio e do carbono, regulando também a produção de metabólitos de sinalização (c-di-GMP), cofatores (NAD⁺) e uma variedade de transportadores importantes para a manutenção e crescimento da célula (Forchhammer; Selim; Huergo, 2022; (Gerhardt *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; Watzer *et al.*, 2019). Entender como as proteínas PII interagem e regulam seus alvos já trouxe conhecimento científico necessário para o desenvolvimento de diversas biotecnologias, como a produção de antibióticos como o ascomicina de *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* e a síntese de biopolímeros, como cianofilina, L-alanil-L-glutamina e PHB, que possuem potencial para aplicações médicas em vacinas e medicamentos e para substituir polímeros comuns em embalagens (Wang *et al.*, 2021; Watzer *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2020; Orthwein *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2020; Popa; Frone; Panaitescu, 2022). Além disso, o funcionamento do mecanismo de PII já foi visto como possível de ser aplicado na biologia sintética para desenvolver biossensores celulares (Berg; Hung; Yellen, 2009; Lüddecke; Forchhammer, 2013; Lüddecke *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Ademais, foi através do estudo de PII e sua participação na fixação biológica de nitrogênio que foram desenvolvidas cepas bacterianas mais eficientes na fixação de nitrogênio, com o intuito de diminuir o uso de adubos nitrogenados, que contribuem para uma série de problemas ambientais (Souza *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2023). Atualmente, diversas estirpes de bactérias fixadoras de

nitrogênio mais eficientes são comercializadas para agricultores pela EMBRAPA (Hungria, 2011).

A enzima UmpH possui importante papel na manutenção da homeostase da via *de novo* de nucleotídeos pirimidina (Reaves *et al.*, 2013). Para além da importância na produção de nucleotídeos para atuarem na replicação e transcrição e para manter a integridade celular, já foi visto que as vias biossintéticas *de novo* possuem ligação com virulência de importantes patógenos humanos e que diferentes espécies requerem essas vias para virulência total (Goncheva; Chin; Heinrichs, 2022). Já foram identificados inibidores da biossíntese *de novo* de purinas como um meio de competição entre espécies em bactérias (Goncheva; Flannagan; Heinrichs, 2020; Sause *et al.*, 2019). Por serem vias extremamente importantes para a replicação bacteriana e, conseqüentemente, para sua patogênese, essas vias podem ser alvos de terapias antimicrobianas (Goncheva; Chin; Heinrichs, 2022). O uso de moléculas semelhantes a nucleosídeos para tratamento já está sob estudo, surgindo como uma opção para contornar o uso indiscriminado de antibióticos e a consequente resistência microbiana (Thomson; Lamont, 2019). Com isso, fica evidente a importância de compreender melhor essa via metabólica, suas enzimas e reguladores.

Compreender qual o mecanismo de interação entre UmpH e PII pode trazer novas informações relevantes para a via *de novo* e o metabolismo central de nucleotídeos, assim como novos dados para entender a rede global de regulação das proteínas PII. Além disso, essas informações podem ajudar a entender como PII age em outros alvos ainda não investigados e extrapolar para ortólogos de PII presentes em outros organismos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEÍNAS PII

As proteínas da família PII foram descobertas na década de 1960 por Bennett Shapiro, enquanto realizava experimentos para descobrir como a enzima glutamina sintetase (GS), peça-chave no metabolismo bacteriano de nitrogênio, era regulada (Shapiro, 1969). A partir dessa época, essas proteínas vêm sendo estudadas mundialmente.

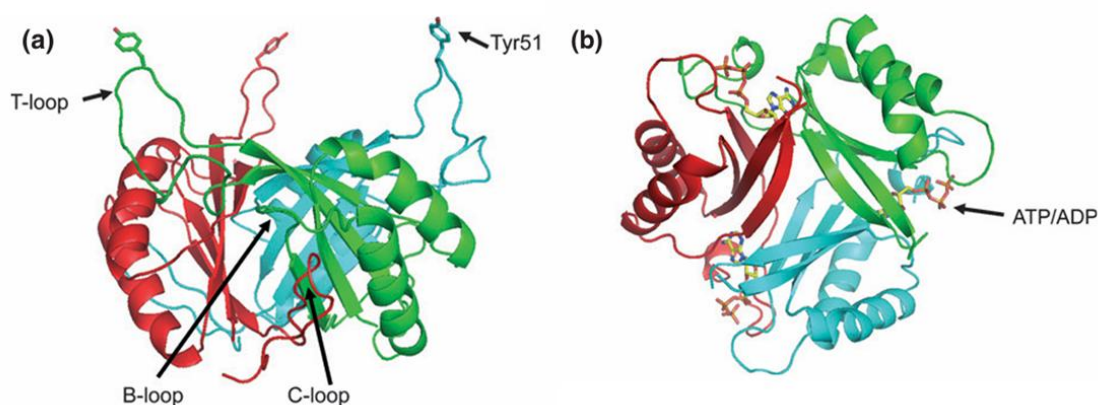
As proteínas PII são transdutoras de sinais, pois sentem o estado de energia da célula, a partir dos níveis de nitrogênio, carbono e outras moléculas como ADP, ATP, 2-OG e glutamina (Huergo; Chandra; Merrick, 2013; Huergo *et al.*, 2012). Com isso, conseguem regular uma infinidade de alvos, entre eles proteínas de membrana, enzimas e fatores de transcrição, através da interação proteína-proteína (Huergo; Chandra; Merrick, 2013). Além disso, essas proteínas estão amplamente distribuídas em diferentes organismos como bactérias, arqueias, algas e plantas (Huergo; Chandra; Merrick, 2013).

Sua classificação segue dois critérios: conservação da ligação genética (vizinhança no genoma) e similaridade da sequência de aminoácidos. São divididas em quatro subgrupos: 1- GlnB, com genes ligados principalmente a *glnA* (o gene estrutural GS) ou *nadE* (que codifica a NAD sintetase), sendo encontrado majoritariamente em proteobactérias e cianobactérias; 2- GlnK, genes relacionados com *amtB* (o gene estrutural para a proteína do canal de amônia); 3- Nifl, genes relacionados com fixação biológica de nitrogênio e a enzima nitrogenase; 4- PII-*New Group* (PII-NG), genes encontrados em proteobactérias e em alguns bacteroides adjacentes a genes que codificam para bombas de efluxo de metais pesados (Arcondéguy; Jack; Merrick, 2001).

Representativas características das PII são a alta similaridade na sequência primária e na estrutura, sendo altamente conservadas entre si (Huergo; Chandra; Merrick, 2013). A partir de estruturas tridimensionais resolvidas de PII, foi visto que são proteínas homotriméricas, geralmente formadas por 112 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 37 kDa, com cada subunidade contendo entre 12-13 kDa e estáveis a altas temperaturas, possuindo temperatura de fusão em torno de 60 e 70 °C (Carr *et al.*, 1996; Moure *et al.*, 2012; Truan *et al.*, 2010).

A estrutura das PII é formada por 3 alças principais (figura 1). A alça T (*T-loop*) é flexível, conservada, exposta ao solvente e muito importante para interações de PII com seus alvos, já sendo descrito como essencial para a interações entre GlnB de *E. coli* e seus alvos adeniltransferase (GlnE), uridiltransferase (GlnD) e a proteína histidina quinase NtrB (Jiang *et al.*, 1997; Jiang; Zucker; Ninfa, 1997; Huergo; Chandra; Merrick, 2013). A alça T (resíduos 37–55) é ainda indicada como passível de modificações pós-traducionais, como a uridililação que ocorre no resíduo Tyr51 de proteobactérias e regula diversas interações de PII (Jaggi *et al.*, 1996). Duas alças menores, as alças C (*C-loop*, resíduos 102-105) e B (*B-loop*, resíduos 82-88), também estão presentes na estrutura (Huergo; Chandra; Merrick, 2013). A alça B está localizada entre a segunda α -hélice e a quarta β -hélice, e a alça C está localizada no C-terminal da proteína (Huergo; Chandra; Merrick, 2013). O trímero de PII forma um barril compacto em que cada monômero é composto por duas α -hélices e quatro β -fitas organizadas em motivo $\beta\alpha\beta$, sendo conectadas por uma alça de 19 aminoácidos, a alça T (Cheah *et al.*, 1994). A interação entre as alças T e B de uma subunidade e a alça C de outra formam uma fenda lateral entre os monômeros, sendo importante para a ligação dos efetores, como ATP e ADP (Truan *et al.*, 2010).

FIGURA 1 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS PII DE *Escherichia coli*



FONTE: Huergo; Chandra; Merrick (2013).

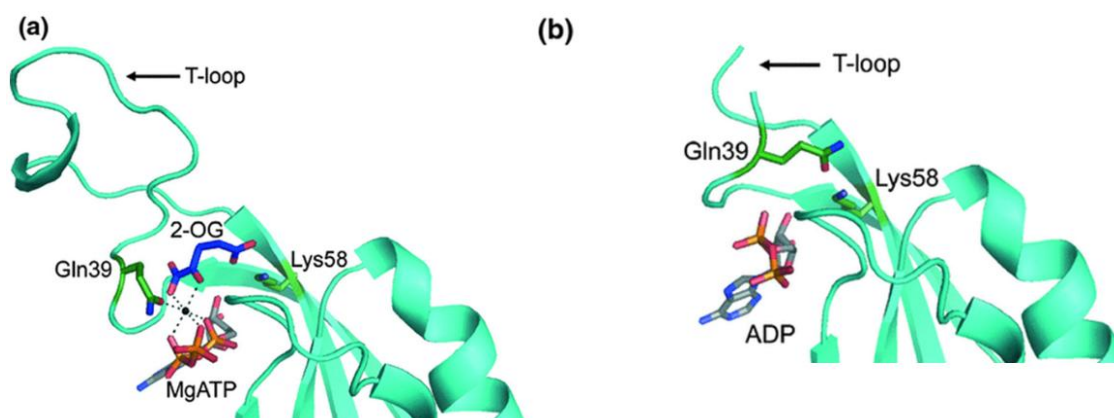
LEGENDA: **(a)** Vista lateral do trímero GlnB de *E. coli* (PDB:2PII) na ausência de ligantes. As setas indicam as alças B, C e T, e o resíduo Try51. **(b)** Vista da superfície da alça T do trímero de GlnK de *E. coli* ligado a ATP (PDB2:1). A seta indica a fenda entre as subunidades dentro da qual o ATP e ADP se ligam de forma competitiva.

2.2 PROTEÍNAS PII E SEUS EFETORES

As proteínas PII de procariotos podem se ligar a diferentes efetores, sendo eles ADP, ATP e 2-OG. Com isso, algumas combinações de interação são possíveis, entre elas ADP, ATP, ATP + Mg^{2+} (Mg.ATP) e Mg^{2+} + ATP + 2-OG (Merrick, 2015).

A ligação de 2-OG só é possível na presença de ATP e Mg^{2+} , pois 2-OG age cooperativamente com ATP, estabilizando sua interação com as PII, enquanto ambos coordenam o íon Mg^{2+} . O 2-OG se liga dentro da fenda lateral entre subunidades vizinhas, e o Mg^{2+} fica localizado entre ATP e 2-OG (figura 2a) (Truan *et al.*, 2010; Huergo; Chandra; Merrick, 2013). O grupo 5-carboxi do 2-OG forma uma ponte salina com o resíduo Lys58 de PII, enquanto o resíduo Gln39 participa da coordenação de Mg^{2+} como o sexto ligante (figura 2a), juntamente com três grupos fosfato de ATP e dois 2-OG (Truan *et al.*, 2010; Huergo; Chandra; Merrick, 2013). Nesse estado, a alça T é projetada perpendicularmente ao eixo central da proteína (Truan *et al.*, 2010).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA LIGAÇÃO ENTRE PII E SEUS EFETORES



FONTE: Huergo; Chandra; Merrick (2013).

LEGENDA: Em ciano está representada um monômero de GlnZ de *Azospirillum brasilense*. 2-OG está representado como bastão azul e Mg^{2+} como uma bola preta, com sua coordenação octaédrica em linhas pretas tracejadas. Em (a) temos a estrutura de PII ligada a Mg.ATP e 2-OG, em que o resíduo Gln39 (bastão verde) participa da coordenação do íon. Em (b) a estrutura de PII interagindo com ADP, em que os resíduos Gln39 e Lys58 (bastões verdes) interagem entre si.

ADP se liga à PII através da fenda lateral entre subunidades (figura 2b), assim como ATP. Na estrutura com ADP ligado a proteína PII de *E. coli* GlnK, cada monômero continha uma molécula de ADP, com a alça T assumindo uma

conformação estendida com duas fitas curtas de folhas β antiparalelas separadas por uma volta β , fazendo com que ela se estenda 28 Å acima do núcleo da proteína, e essa conformação foi vista como essencial para GlnK interagir com um de seus alvos, a proteína AmtB (Conroy *et al.*, 2007; Huergo; Chandra; Merrick, 2013). Apesar de ADP e ATP se ligarem igual às PII, com as ligações de hidrogênio entre a base nitrogenada e a metade do açúcar de ADP e ATP serem as mesmas, na interação com ATP a alça T é desordenada além do resíduo G37, mas na interação com ADP a alça T é totalmente ordenada, sendo observado uma ligação que fixa uma dobra de 90° na cadeia GlnK em R38 (Conroy *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 1998).

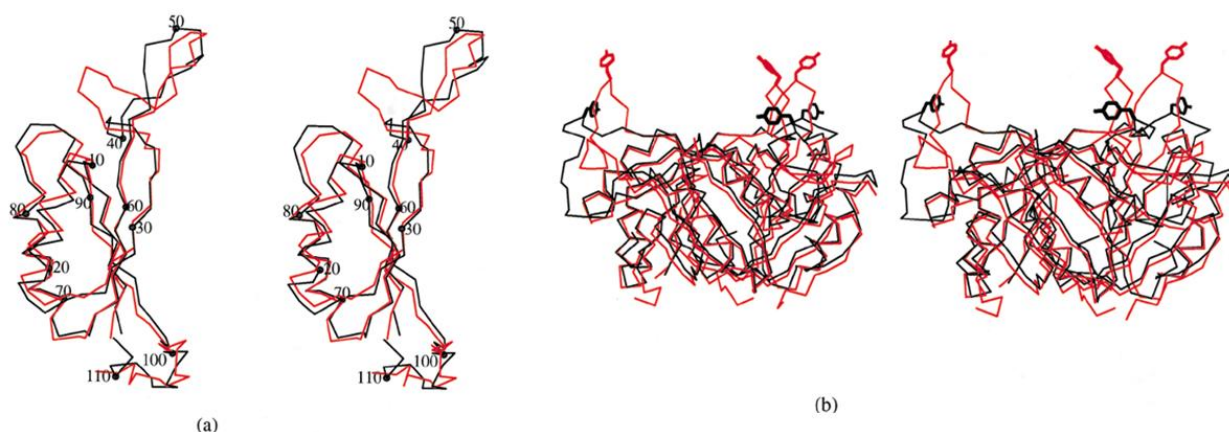
Foi visto que ADP e ATP se ligam competitivamente às PII, pois ocupam o mesmo sítio de ligação, enquanto ADP e 2-OG contrapõem a ligação um do outro (Jiang; Pioszak; Ninfa, 2007). A explicação mais aceita para isso seria que com níveis altos de 2-OG, PII estará principalmente ligada a 2-OG e Mg.ATP, porém, quando os níveis de 2-OG caem, a interação mais predominante será com ADP (Radchenko; Thornton; Merrick, 2010). Os resíduos Gln39 e Lys58, que estão envolvidos na interação com os efetores (figuras 2a e 2b), são altamente conservados entre as PII, e a mudança de posicionamento desses resíduos causada pelos diferentes efetores é um fator de modificações na base da alça T, que consequentemente influencia sua conformação e a interação entre PII e seus alvos (Truan *et al.*, 2010; Huergo; Chandra; Merrick, 2013). Isso explica por que PII não interage com diversos alvos quando 2-OG e Mg.ATP estão ligados.

2.3 PROTEÍNAS PII DE *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* possui duas proteínas PII, sendo elas GlnB (produto do gene *glnB*) e GlnK (produto do gene *glnK*) (Ninfa; Jiang, 2005). Ambas as proteínas PII servem como indicadoras de nitrogênio e sofrem modificações pós-traducionais com a adição ou remoção de até três UMP pela enzima GlnD (*UTase/UR*) (Engleman; Francis, 1978). Se o nível de nitrogênio disponível na célula é baixo, as proteínas PII estarão uridililadas, mas se o nível de nitrogênio for alto, não estarão (Engleman; Francis, 1978). Sendo assim, PII nativas (sem modificações) indicam uma célula rica em nitrogênio e PII uridililadas (PII-UMP₃) indicam um ambiente pobre em nitrogênio (Engleman; Francis, 1978; Xu *et al.*, 1998).

GlnB e GlnK compartilham 67% de identidade de aminoácidos e alta similaridade estrutural (figura 3) (Van Heeswijk *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998). As principais diferenças em suas estruturas estão nas alças (Xu *et al.*, 1998). A alça T, apesar da alta similaridade em sequência primária, se mostrou mais desordenada em GlnK (figura 3b), porém, esse resultado é influenciado por sua alta flexibilidade, que pode gerar diferentes conformações, e pela condição em que o cristal da proteína foi formado (Xu *et al.*, 1998). Além disso, há diferenças significativas nas alças B e C e na forma como suas subunidades se agrupam para formar o trímero (Xu *et al.*, 1998). Com isso, há diferenças em suas conformações (figura 3), e consequentemente, em seus alvos e funções (Xu *et al.*, 1998).

FIGURA 3 - SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE GlnK E GlnB DE *Escherichia coli*



FONTE: Xu *et al.* (1998).

LEGENDA: A estrutura de GlnK está em preto e a estrutura de GlnB está em vermelho. (a) comparação entre as subunidades. (b) os trímeros vistos no eixo de 3 dobras. O resíduo Tyr51 da alça T está representado acima das subunidades.

Quando os níveis de nitrogênio estão baixos, a uridililação das PII serve também para alterar a atividade da enzima GlnE (Adenilil-Transferase ou ATase), que por consequência, altera e ativa a enzima glutamina sintetase (GS) (Xu *et al.*, 1998). GS é um dos elementos-chave na regulação do metabolismo de nitrogênio, e em alto nível de nitrogênio, tem sua atividade inativada. (Xu *et al.*, 1998). Essa função foi primeiramente atribuída a GlnB, porém foi visto a partir de células mutantes de *E. coli* com deleção de GlnB, que GlnK também pode assumir essa função, mas a atividade resultante de GS é diferente (Van Heeswijk *et al.*, 1995).

GlnK é altamente expressa quando o nível de nitrogênio disponível na célula é baixo e sua expressão está diretamente relacionada a esses níveis (Xu *et al.*,

1998). No operon onde o gene *glnK* está, juntamente com o gene *amtB*, há um sítio de ligação de RNA polimerase σ^{54} (ligado principalmente ao estresse celular) e outro da proteína NtrC, sendo a regulação do operon dependente desta proteína (Van Heeswijk *et al.*, 1996). Estudos anteriores mostraram que GlnK se liga fortemente à proteína transportadora de amônio AmtB e regula o fluxo de entrada de amônio na célula, em resposta a concentração de nitrogênio intracelular e mudanças externas na disponibilidade de amônio (Javelle *et al.*, 2004). A ligação de GlnK à AmtB inativa o canal de amônio, através da inserção das suas alças T na saída do poro citoplasmático, bloqueando a condução de amônio para dentro da célula (Conroy *et al.*, 2007). Essa interação é regulada pelos níveis de 2-OG e pela uridililação de GlnK, que inibem o complexo (Durand; Merrick, 2006; Conroy *et al.*, 2007). Além disso, os altos níveis de GlnK, que se acumulam durante os períodos de privação de nitrogênio, atuam como um tampão para aliviar o excesso de importação e assimilação de nitrogênio, em resposta ao seu aumento subsequente (Gosztolai *et al.*, 2017).

Novos alvos de PII, principalmente de GlnB, estão sendo estudados e demonstram que o papel de PII vai além da regulação de nitrogênio. Foi visto que GlnB de *E. coli* está envolvida na regulação da biossíntese de ácidos graxos, com a formação de um complexo ternário com os componentes biotina carboxilase (BC) e proteína transportadora de biotina carboxila (BCCP) da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), que catalisa a etapa limitante e comprometedora da via, e essa interação resulta na inibição da ACC, diminuindo seu número de renovação enzimática (Gerhardt *et al.*, 2015). Ainda em GlnB de *E. coli*, foi vista a interação com a enzima glucosamina 6-fosfato desaminase (NagB), que participa do catabolismo de açúcares amino usando N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcN-6P) como substrato para liberar amônia e frutose 6-fosfato (Rodionova *et al.*, 2018). GlnB uridililada aumentou a atividade de NagB em torno de dez vezes, enquanto GlnB não uridililada não apresentou efeito, mostrando o controle de GlnB no catabolismo de aminoácidos (Rodionova *et al.*, 2018). Por fim, um estudo recente mostrou a interação entre GlnB de *E. coli* e L-aspartato desaminase (AspA) e a ativação da sua atividade de desaminação, que libera amônia de L-aspartato, como parte da eliminação de nitrogênio (Schubert *et al.*, 2020). Além disso, a regulação de AspA por GlnB pode prevenir um ciclo fútil de biossíntese e degradação de L-aspartato quando o amônio está disponível (Schubert *et al.*, 2020).

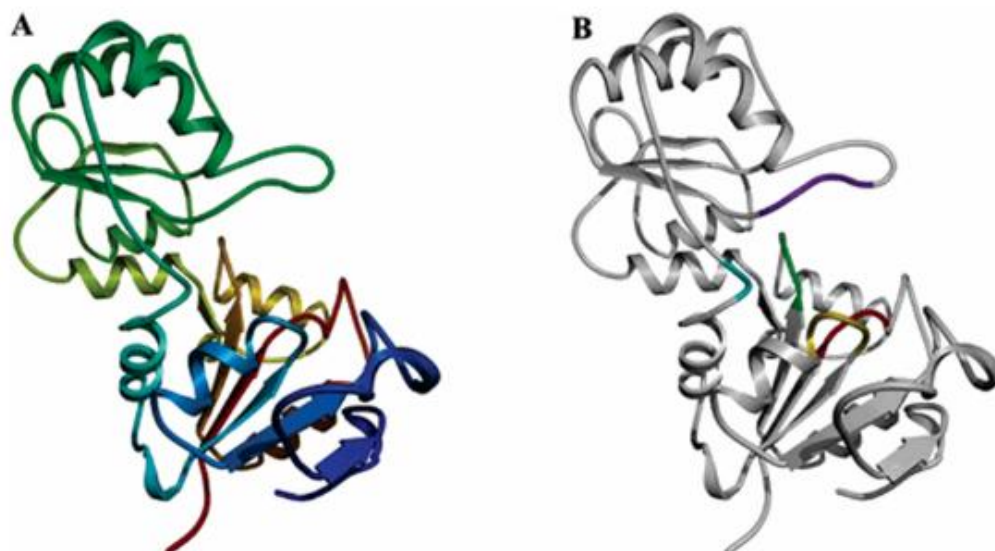
Um sistema de dois componentes é formado por uma histidina quinase (proteína NtrB) e uma proteína regulatória (NtrC) (Ninfa *et al.*, 1993). Ao ocorrer a fosforilação de um resíduo de NtrB, há a fosforilação de NtrC, que ativa a transcrição de genes alvo regulados pelos níveis de nitrogênio, através da ligação a intensificadores localizados próximos aos promotores (Ninfa *et al.*, 1993; Blauwkamp; Ninfa, 2002). A fosforilação de NtrB está relacionada com os níveis de nitrogênio e é regulado pelas proteínas PII, onde as mesmas estimulam a fosforilação em condições de baixo nitrogênio (Van Heeswijk *et al.*, 1996). Segundo Blauwkamp e Ninfa (2002), GlnB teria papel principal na regulação desses genes com altos níveis de nitrogênio, enquanto GlnK impediria a expressão descontrolada durante a privação de nitrogênio. As proteínas NtrC e NtrB, juntamente com as proteínas PII e outras enzimas, fazem parte do sistema central de regulação de nitrogênio, chamado de Ntr (Merrick; Edwards, 1995).

2.4 UMP FOSFATASE (UmpH)

A enzima UMP fosfatase (UmpH) está presente na bactéria *E. coli* e faz parte da superfamília de proteínas Haloalkane Dehalogenase (HADSF), sendo uma família presente em todos os organismos na natureza e muito numerosa, sendo que apenas em *E. coli* são encontradas 37 diferentes proteínas (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). Os membros dessa família são caracterizados por possuir um domínio central α/β (*core domain*) altamente conservado, formado pelo sítio catalítico composto por quatro alças (alças I-IV) (figura 4) (Allen; Dunaway-Mariano, 2006). Os resíduos presentes nesse domínio central interagem com cofator Mg^{2+} e com o substrato da enzima, sendo que o domínio e o substrato interagem através do grupo fosforil que é transferido (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). Esta é outra característica dessa superfamília, onde a maioria dos seus membros são fosfotransferases que utilizam a água como receptor do grupo fosforil (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). Substratos maiores normalmente interagem com as enzimas dessa família através do domínio central, porém, substratos menores normalmente entram no sítio ativo do domínio central e são cobertos pelo domínio móvel cap, que faz a interação possível. O domínio cap é considerado elemento chave na evolução de funções das proteínas dessa família, conferindo

principalmente especificidade aos substratos (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006).

FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UmpH



FONTE: Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen (2006).

LEGENDA: **(A)** N-terminal da proteína em azul e o C-terminal em vermelho. **(B)** estão destacadas as alças I-IV em vermelho, verde, ciano e dourado, respectivamente. O domínio cap é representado em roxo.

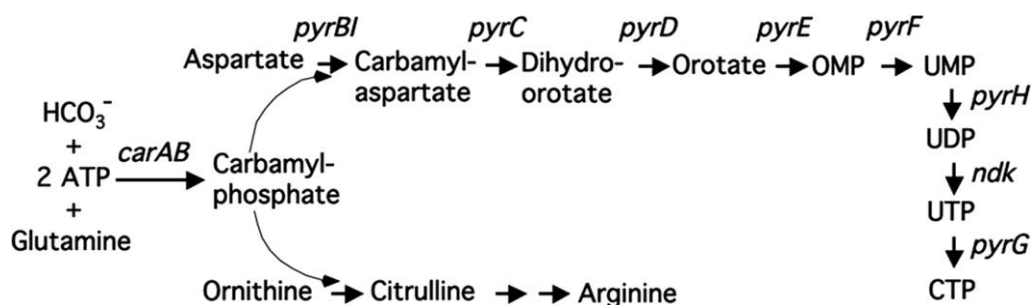
As proteínas da HADSF são classificadas de acordo com a presença, posição e dobra do domínio cap. A proteína UmpH é classificada como tipo IIA. As proteínas tipo IIA são caracterizadas por ter o domínio cap entre as alças II e III do domínio central e possui duas dobras α/β diferentes, designadas IIA e IIB (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). Em UmpH o domínio cap vai do resíduo 71 a 175 e forma quatro α -hélices e cinco folhas- β (figura 4). Ainda em UmpH, a alça I participa da catálise ácido/base necessária para a transferência de fosforil; a alça II normalmente forma ligações de hidrogênio com o grupo fosforil do substrato; a alça III fornece proteção eletrostática para a transferência do grupo fosforil e a alça IV liga o cofator Mg^{2+} (figura 4B) (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006).

UmpH possui 250 aminoácidos e 27 kDa por monômero, e já foi relatado que se apresenta como monômero em solução aquosa (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006).

2.4.1 Via *de novo* de biossíntese de pirimidinas

As pirimidinas compreendem bases nitrogenadas resultantes do anel pirimídico, como citosina, uracila e timina, e formam os nucleotídeos que são utilizados para sintetizar os materiais genéticos RNA e DNA (Kilstrup *et al.*, 2005). A biossíntese de pirimidinas pela via *de novo* começa com a formação de carbamoil fosfato (CP), uma molécula que é precursora tanto da biossíntese da pirimidina quanto da biossíntese do aminoácido arginina (figura 5). A reação é catalisada por CarA e CarB a partir de L-glutamina, bicarbonato e 2 moléculas de Mg.ATP (figura 5). O CP é então convertido em carbamoilaspartato, que é catalisado por PyrB (figura 5). O carbamoilaspartato pode então ser modificado reversivelmente para um composto chamado diidroorotato por PyrC, que é o primeiro ponto onde a estrutura do anel é formada (figura 5). A próxima reação, resultando em orotato, é o ponto onde uma ligação dupla é introduzida na estrutura do anel, formando essencialmente o primeiro composto de pirimidina (figura 5). Isso é realizado por duas enzimas, PyrK e PyrD. O orotato é então convertido em orotidina-5-fosfato por PyrE, na presença de PRPP (figura 5). O último passo para a formação de UMP é catalisado por PyrF, que descarboxila irreversivelmente a orotidina-5-fosfato em UMP (figura 5) (Goncheva; Chin; Heinrichs, 2022). UMP é o precursor de todos os nucleotídeos de pirimidina e é usado para sintetizar UDP, UTP, dTTP, CTP e dCTP (figura 5) (Loffler *et al.*, 2005; Turnbough; Switzer, 2008).

FIGURA 5 - VIA BIOSSINTÉTICA DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIMIDINA EM *Escherichia coli*



FONTE: TURNBOUGH; SWITZER (2008).

LEGENDA: Os nomes dos genes são usados para representar as enzimas biossintéticas codificadas que fazem parte da via *de novo*.

A homeostase dessa via pode ser feita de duas maneiras: pela retroalimentação canônica e pelo metabolismo de transbordamento (Reaves *et al.*, 2013). Na retroalimentação canônica, o próprio excesso de produtos da via inibe as duas primeiras enzimas da via, sendo elas a Aspartato transcarbamoilase (ATCase; representada na figura 5 por seu gene *pyrBI*), inibida pelo aumento de UTP e CTP, os produtos finais da via, e a enzima Carbamoil Fosfato Sintetase (CPSase; representada na figura 5 pelo seu gene *carAB*), que é inibida por UMP (Kantrowitz, 2012). Essa estratégia de homeostase contribui para a eficiência da via, impedindo o refluxo desnecessário (Reaves *et al.*, 2013). O metabolismo de transbordamento surge como uma explicação para a função de UmpH (Reaves *et al.*, 2013).

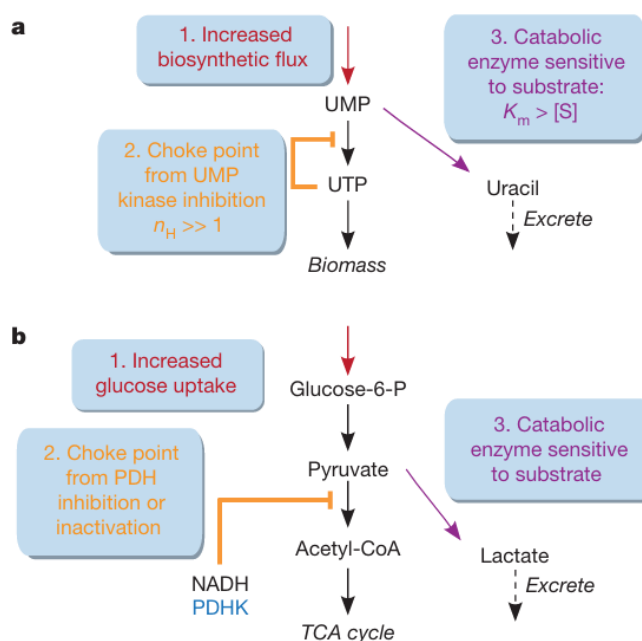
2.4.2 Função de UmpH

A proteína UmpH é codificada pelo gene *nagD*, que faz parte do operon *nagEnagBACD*, sendo seus produtos relacionados no processamento celular de N-acetylglucosamine (GlcNAc), um componente essencial da biossíntese da parede celular bacteriana (Plumbridge, 1989; Peri; Goldie; Waygood, 1990). Sendo assim, antes de ser sugerida uma função para UmpH, houve suspeitas de que sua função estaria ligada a reciclagem de parede celular. Já foi visto que UmpH pode usar uma ampla gama de substratos diferentes, mas que tem preferência por nucleotídeos monofosfatos, como exemplo de uridina 5'-monofosfato (UMP) e guanosina monofosfato (GMP) (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006).

A UmpH está envolvida na homeostase da via *de novo* de pirimidinas através do metabolismo de transbordamento (Reaves *et al.*, 2013). Após diversos experimentos envolvendo mutantes de proteínas e enzimas importantes para a via *de novo*, foi visto que as enzimas UmpH e UmpG desviam UMP da via, retiram seu grupo fosfato o transformando em uridina e pôr fim a uridina é quebrada em uracila por outra enzima (Reaves *et al.*, 2013). Outro ponto visto pelos autores, é que com o excesso de UTP, é formado um ponto de estrangulamento na enzima UMP quinase, responsável por converter UMP em UDP (figura 6a) (Reaves *et al.*, 2013). Ao inibir a enzima UMP quinase de formar UDP, os níveis de UMP aumentam, e é então desviado por UmpH para manter a homeostase da via e dos produtos finais (Reaves *et al.*, 2013). Foi visto ainda que a concentração intracelular de UMP está em torno de 52 μM , e o K_m da UmpH para este substrato é de 120 μM , portanto é visto que a

acumulação de UMP tem papel central na regulação por UmpH e na via de transbordamento (figura 6a) (Reaves *et al.*, 2013). Esse mecanismo é semelhante ao transbordamento no metabolismo central de carbono, em que o catabolismo excessivo de açúcar (normalmente via glicólise) leva ao acúmulo de piruvato, que pode ser excretado como lactato, etanol ou acetato, dependendo do organismo (figura 6b) (Reaves *et al.*, 2013).

FIGURA 6 – METABOLISMO DE TRANSBORDAMENTO



FONTE: Reaves *et al.* (2013).

LEGENDA: Figura esquemática de como ocorre a regulação da via de novo através do metabolismo de transbordamento e a comparação com o metabolismo de transbordamento de carbono central. **A.** O aumento do fluxo biossintético (1) causa o acúmulo de UTP, que por sua vez forma um ponto de estrangulamento (2) e inibe a enzima de que catalisa UMP em UDP, com isso, o acúmulo de UMP é desviado por UmpH (3) que causa sua desfosforilação e é metabolizado até uracila. **B.** Mecanismo semelhante no metabolismo central do carbono. PDH, piruvato desidrogenase; PDHK, piruvato desidrogenasequinase (que catalisa a fosforilação inibitória da PDH); TCA, ácido tricarboxílico.

Assim como em *E. coli*, os eucariotos possuem múltiplas nucleotidases intracelulares com diferentes especificidades de substrato, como UmpH (no caso de *E. coli*) e outras enzimas da família HAD (Proudfoot *et al.*, 2004; Kuznetsova *et al.*, 2006). Essas nucleotidases de *E. coli* podem desfosforilar uma ampla gama de nucleotídeos 2', 3' e 5' e podem estabelecer ciclos de substrato regulatório

controlando os níveis de nucleotídeos na célula bacteriana, semelhantes aos descritos em mamíferos (Bianchi; Spsychala, 2003; Kuznetsova *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido como parte de uma Iniciação Científica apoiada pelo CNPq, que deu origem a este Trabalho de Conclusão de Curso. O alvo UmpH investigado no presente trabalho, foi descoberto através de ensaios de *ligand fishing* com as proteínas PII de *E. coli*, realizados pela Tatiana de Mello Damasco Nunes durante sua Iniciação Científica, sob orientação dos professores Luciano Fernandes Huergo e Gustavo Antônio de Souza. Os resultados obtidos a partir desses trabalhos, incluindo o *ligand fishing*, foram compilados em um artigo que atualmente está publicado na revista Journal of Biological Chemistry (JBC) (GONÇALVES *et al.*, 2024). Nas próximas sessões, a metodologia, resultados e discussão serão apresentados em inglês no formato do artigo publicado.

3.1 PII LIGAND FISHING AFFINITY CHROMATOGRAPHY

The *E. coli* PII proteins, GlnB or GlnK, were expressed using *E. coli* BL21(DE3) carrying the plasmids pTRPETHisGlnB or pTRPETHisGlnK, respectively. These plasmids are based on pET28a and were described previously (Gerhardt *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2014). Cells were cultured in 300 ml of LB medium containing kanamycin $100\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ to an $A_{600\text{nm}}$ of 0.5, IPTG 0.5mM was added and the cultured incubated for 3h at 37°C under vigorous shaking. Cells collected by centrifugation, resuspended in 10ml of buffer A (Tris-HCl 50mM pH 8; KCl 0.1M; imidazole 20mM) and sonicated on an ice bath. After centrifugation at 20,000xg for 20 min at room temperature, the soluble fraction was recovered and loaded onto a Protino 1000 Ni-IDA column (Macherey-Nagel). The columns were washed using 15ml of buffer A containing imidazole 60mM to removed loosely bound proteins and keep the bait proteins His-GlnB or His-GlnK on two separate columns.

The prey proteins were obtained from *E. coli* FT8000 $\Delta\text{glnBglnK}$ (Coutts *et al.* 2002), 300 ml of cells were cultured on LB medium to an $A_{600\text{nm}}$ of 0.5. Cells were collected by centrifugation, resuspended in 10 ml of buffer B (Tris-HCl 50mM pH 8; KCl 0.1M; imidazole 20mM; MgCl_2 5mM) and sonicated on an ice bath. After

centrifugation at 20,000xg for 20 min at room temperature, the soluble fraction was recovered and mixed with ATP to 1mM final concentration. The two prey columns prepared as described in the previous paragraph (containing mobilized His-GlnB or His-GlnK) along with an empty control Protino 1000 Ni-IDA column (Macherey-Nagel) were connected in series (in this order: control, His-GlnB and His-GlnK). Columns were washed with 10mL of buffer C (buffer B containing ATP 1mM) and loaded with the cell extract from *E. coli* FT8000 Δ *glnB**glnK*. The columns were separated and individually washed with 12 ml of buffer C. The final 2 ml was collected to be used as flowthrough background controls. The columns were eluted with 2ml of buffer D (buffer C containing 2-OG 1.5mM), this final fraction was collected to identify proteins that were specifically eluted by 2-OG in the presence of PII proteins. The recovered fractions were analyzed by SDS-PAGE or by label free quantitative LC-MS/MS as described previously (Gravina *et al.*, 2018).

3.2 IN GEL PROTEIN DIGESTION AND MASS SPECTROMETRY ANALYSIS

Protein bands excised from Coomassie stained SDS-PAGE gels were subjected to in-gel digestion with sequencing-grade trypsin as described (Huergo *et al.*, 2010). MALDI-TOF were performed mixing the hydrolyte sample with a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in acetonitrile 50% v/v and TFA 0.1% v/v. This mixture was spotted onto the MALDI target plate and allowed to dry. Mass spectra were acquired using a MALDI-TOF/TOF Autoflex II spectrometer (Bruker Daltonics). Raw data was converted to a monoisotopic peak list using the FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics). Database search was performed using the online Mascot server (<https://www.matrixscience.com/>), the *E. coli* database and error tolerance of 100 ppm for PMF search and for parent ion MS/MS search; the MS/MS fragment tolerance error was set to 0.3 Da.

3.3 LABEL FREE LC/MS/MS PROTEOMICS

Proteins enriched in the fraction eluted with 2-OG from the His-tagged GlnK Ni²⁺ column were analyzed by label free LC/MS/MS. Briefly, aliquots of 15 μ g of the GlnK affinity column and from the respective control column were suspended in 50 μ l of ammonium bicarbonate 100 mM pH 8.0. Proteins were reduced with DTT 1 mM for

45 min. Modified trypsin (Promega) was added to a 1:50 ratio and incubated overnight at 37 °C. Protein digestion was quenched with TFA 3% (v/v), peptides were extracted with C18 STAGE-TIPs and subjected to technical triplicate LC/MS/MS runs. Samples were analyzed in a QExactive Orbitrap (Thermo Scientific) and the data was processed using MaxQuant version 1.5.2.8 (Cox; Mann, 2008). Search parameters were: trypsin with no Pro restriction, mass deviation of 20ppm and 6ppm for first and main search respectively, oxidation of Met as variable modification. Proteins were identified using an *E. coli* protein database downloaded from Uniprot. Statistical analysis was performed using MaxQuant – Perseus package version 1.5.0.30 and statistically significant differences were assigned using a One-way ANOVA test with p-value threshold of 0.05 and Benjamin Hochberg-based FDR correction. Protein abundance obtained after elution with 2-OG from the GlnK affinity column were compared to protein abundance from an empty control column. Proteins enriched in the GlnK column were identified by volcano plots considering the log of p value vs log2 of fold change.

3.4 PLASMIDS USED FOR PROTEIN EXPRESSION

The amino acid sequence of the UmpH (NagD) protein was retrieved from Uniprot (P0AF24.1). The *umpH* gene was synthesized and cloned into pET29a by General Biosystems. Plasmids, pTRPETHisGlnB and pTRPETHisGlnK, expressing GlnB and GlnK proteins with a histidine tag in the N-terminal have been described previously (Gerhardt *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2014). The pDOP1 plasmid was used to express the *E. coli* GlnD (Kamberov *et al.*, 1994). Plasmids pMSA3 and pLMA-MLV1 were used to express GlnZ and GlnB from *Azospirillum brasiliense* with a histidine tag at N-terminal, respectively (Araujo *et al.*, 2004, Huergo *et al.*, 2007). The plasmid pMSA4 Δ loopT expressing the version of GlnZ containing a deletion on the T-loop (GlnZ Δ 42-54) was used to generate a N-terminal His-tagged fused version, by subcloning *glnZ* *Nde*I and *Bam*HI fragment of pMSA4 Δ loopT into the *Nde*I and *Bam*HI sites of pET28a (Santos *et al.*, 2020). The resulting plasmid was named pGAHisGlnZ Δ loop and was used to express His-GlnZ Δ loop.

3.5 PROTEIN PURIFICATION

Untagged UmpH and His tagged GlnB and GlnK were expressed in *E. coli* BL21 (λ DE3) carrying the respective expression plasmid. Cells were cultivated in 300 mL of LB medium containing kanamycin $100\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ at 37°C with continuous 120rpm shaking. When cells reached an $A_{600\text{nm}}$ between 0.3 to 0.4, the cultured temperature was set to 16°C before the addition of IPTG 0.3mM . The culture was further incubated overnight at 16°C with continuous 120rpm shaking. During GlnB and GlnK proteins expression, 40mM ammonium chloride was added to the culture before the addition of IPTG to avoid protein uridylylation. For GlnD expression, the antibiotic used was ampicillin $100\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ and the protein expression were achieved after the cells reached an $A_{600\text{nm}}$ between 0.3 to 0.4 by changing the shaker temperature from 37°C to 42°C . Cells were incubated for 3 hours at 42°C before being collected by centrifugation.

To purify UmpH, cells were resuspended in 25 mL of sonication buffer (HEPES pH 7.4 50 mM, MgCl_2 10 mM and DTT 5 mM) and disrupted by sonication on ice. Cell extracts were clarified by centrifugation ($20.000 \times g$ for 15 min at 4°C) and 20% of ammonium sulfate was added to supernatant which was kept on ice for 20 min. After another round of centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 4 mL of resuspension buffer (HEPES pH 7.4 50mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2mM). The supernatant was dialyzed overnight at 4°C in 1L of dialysis buffer (HEPES pH 7.4 50mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM and glycerol 50%). After the dialysis, 100 mM of N-acetylglucosamine (NAG) was added as NAG was shown to stabilize the UmpH activity and reduce aggregation (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). The protein preparation was polished using gel filtration chromatography. Samples were separated using a Superdex 200 HiLoad 26/60 (Cytiva) which were equilibrated with 2 volumes of buffer (HEPES pH 7.4 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM and NAG 20 mM). The elution of UmpH was monitored by SDS-PAGE.

The purification of His-GlnB, His-GlnK and GlnD was performed as described previously (Rodrigues *et al.*, 2014; Moure *et al.*, 2012). His-GlnZ, His-GlnB and His-GlnZ Δ loop from *A. brasiliense* were purified as described previously (Araujo *et al.*, 2004; Huergo *et al.*, 2007; Moure *et al.*, 2012). Fully uridylylated GlnB and GlnK proteins were obtained as described previously and the state of fully uridylylation was

confirmed by Native PAGE analysis (Bonatto *et al.*, 2007). All proteins used in this study were quantified using the Bradford assay (Sigma) and kept at -80°C until use.

3.6 IN VITRO PROTEIN COMPLEX ANALYSIS

In vitro complex formation was performed using Magne His nickel magnetic beads (Promega) as described previously (Huergo *et al.*, 2007). All reactions were conducted in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 5 mM de MgCl₂, 10% glycerol (v/v) and 20 mM imidazole in the presence or absence of effectors as indicated in each experiment. Four microliters of the beads were equilibrated by wash with 200 µl of buffer. Binding reactions were performed in 200 µl of buffer by adding 10 µg of His-EcPII or His-AbPII and then 20 µg untagged UmpH. The proteins were mixed at room temperature for 5 min. The beads were washed three times with 200 µl of buffer and samples eluted with SDS-PAGE samples buffer and analyzed by SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie blue and gel band densitometry analyses were performed using Gel Analyzer 19.1.

3.7 UMPH PHOSPHATASE ACTIVITY ASSAYS

The UmpH phosphatase activity was continuously measured using the EnzChek Pyrophosphate Assay Kit (Thermo Fisher E6645), without the addition of pyrophosphatase. The assays were performed duplicates in flat-bottom polystyrene plates (OLEN) containing 180 µl of HEPES pH 7.4 20mM, KCl 50mM, MgCl₂ 5mM, NAG 2mM, DTT 2mM, 2-amino-6-mercapto-7-methyl-purine riboside 0.1mM, purine nucleoside phosphorylase 1 U/mL and UmpH 300ng). Reactions were pre-incubated at 25°C before the addition of 20 µl of the UmpH substrate indicated in each experiment. Reactions were performed in duplicates and continuously monitored measuring A_{360nm} at 25°C using a Tecan infinity 200 microplate reader (Tecan). The mean slope of the linear phase of A_{360nm} vs time was used to obtain the initial velocity in each condition. Initial velocities were fitted into the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism 7.

3.8 BIO-LAYER INTERFEROMETRY ASSAYS

To obtain the kinetic parameters of the GlnK-UmpH complex an Octet K2 Biolayer Interferometry System (FortéBIO) was used. The purified His-GlnK and untagged UmpH were diluted in the interaction buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT and 2 mM NAG). The Ni-NTA Biosensor was first dipped into a solution containing His-GlnK at 9.7 µg/ml for 100 s until a binding signal of approximately 2 nm was obtained. The sensor was washed in binding buffer and then transferred to the analyte solution containing UmpH at different concentrations for 180 s to record the association curve. Finally, the sensor was dipped into the interaction buffer for 180 s to monitor complex dissociation. These analyses were also carried out in the presence of the PII protein effectors 1 mM ADP, ATP or ATP plus 2-OG as indicated in each figure. Data were recorded in duplicates and analyzed with the Octet Data Analysis software using Savitzky-Golay filtering. The fitting of the curve was done with a 1:1 (GlnK trimer:UmpH monomer) ligand model. Curves were then plotted in GraphPad Prism7 software.

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICATION OF UMPH AS NOVEL GLNK INTERACTING PARTNER IN *E. coli*

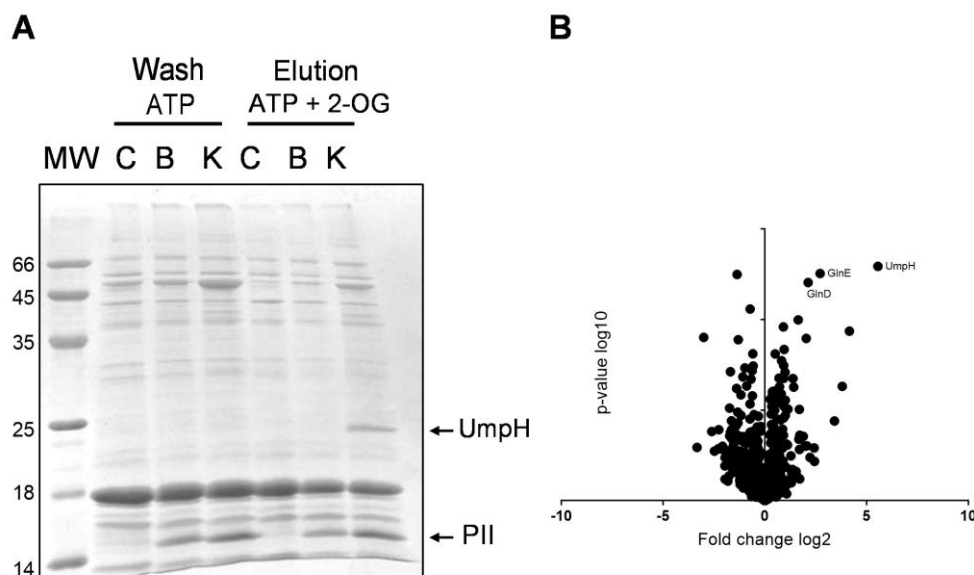
To identify novel PII protein targets, N-terminal His-tagged GlnK or GlnB proteins were immobilized as baits onto Ni²⁺ columns which were incubated with cell free extracts of *E. coli* Δ *glnB**glnK* in the presence of Mg.ATP. After extensive washes, proteins that were retained by His-PII proteins were selectively eluted in buffer containing 1 mM of Mg.ATP and 1.5 mM of 2-OG. The rationale of this approach is that PII proteins adopt a different structure upon 2-OG binding thereby altering the stability of PII-target protein complexes that were eventually formed in the presence of Mg.ATP (Truan *et al.*, 2010).

Comparison of the SDS-PAGE protein profiles of the last Mg.ATP wash fraction with the profile obtained with MgATP and 2-OG, revealed a band of approximately 30 kDa eluting specifically in the presence of 2-OG from the GlnK column (Fig. 1A). This band was not present in neither the control nor in the column

were GlnB was used as bait (Fig. 1A). The band indicated by an arrow in Fig. 1 was excised from the gel, digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Peptide mass fingerprint searches identified that band as NagD, currently named as UmpH, (42% sequence protein coverage). This identification was confirmed by MS/MS ion search of the ion of m/z 2,514 which matched one of the UmpH peptides (ion score 83 with scores >40 being significant at $p < 0.05$).

The proteins eluted from the His-GlnK column after the 2-OG treatment were compared to those eluted from the control column using label free LC/MS/MS analysis. Volcano plots were performed plotting the significance of enrichment ($\log_{10}$ p value) vs the enrichment fold ($\log_2$ fold change). The graphic indicates that UmpH stands out as the major protein enriched in the 2-OG eluate from the column where His-GlnK was used as a bait (Fig. 1B). Two others well characterized GlnK targets, GlnD and GlnE, were also among the most enriched proteins along with UmpH, thereby validating the biological significance of the assay (Fig. 1B).

FIGURE 1. LIGAND FISHING ANALYSIS



SOURCE: The author (2024).

SUBTITLE: **A.** Comparison of the SDS-PAGE protein profiles of the last Mg.ATP wash fraction with the profile obtained after elution with Mg.ATP and 2-OG combined from the different ligand-fishing columns. Empty control column (C), His-GlnB bait column (B) and His-GlnK bait column (K). MW indicate molecular weight markers (kDa). The UmpH and PII bands are indicated by arrows. **B.** The proteins eluted from the His-GlnK column after the Mg.ATP + 2-OG treatment were compared to those eluted from the control column using label free LC/MS/MS analysis. Volcano plots were prepared using the significance of enrichment (p value log

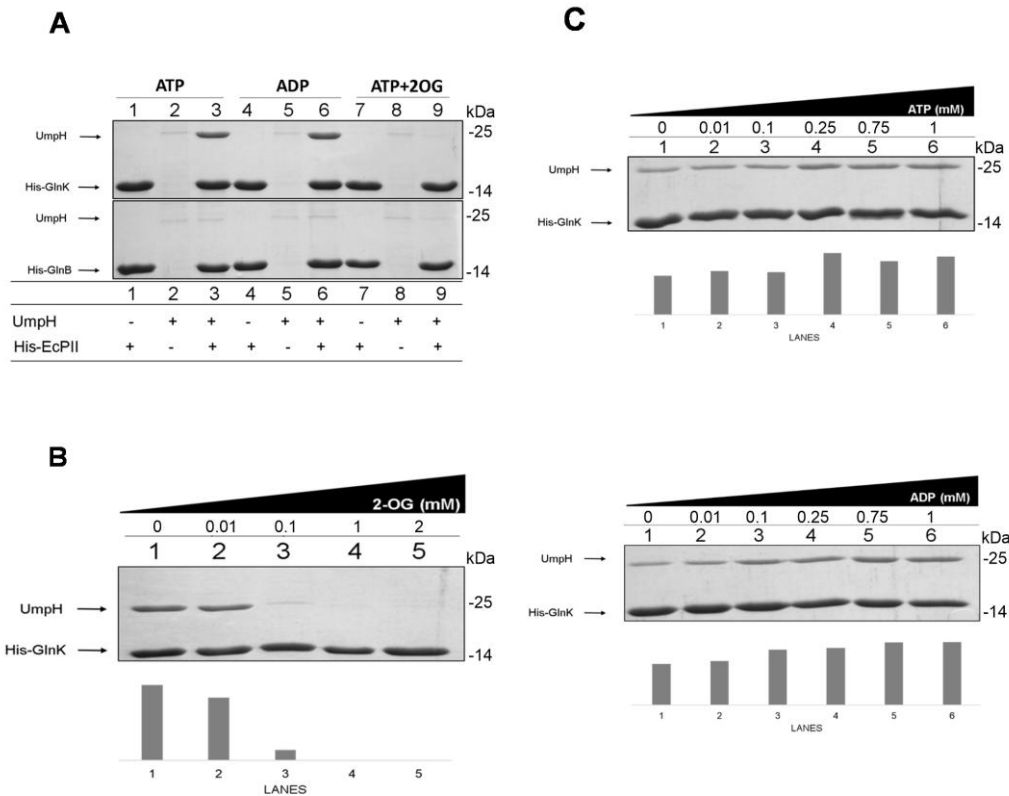
10) vs the enrichment fold (fold change log 2). The most significant enriched proteins in the His-GlnK column in comparison to the control column are indicated by their respective names GlnE, GlnD and UmpH.

4.2 CHARACTERIZATION OF THE UMPH-GLNK COMPLEX

To confirm the specificity of the identified UmpH-GlnK protein interaction, untagged recombinant UmpH was purified to homogeneity and challenged for interaction using His-GlnK or His-GlnB as bait by co-precipitation using Ni²⁺ magnetic beads under different conditions. The data shown in Fig. 2A confirmed that UmpH co-elutes with GlnK but not with GlnB. The UmpH-GlnK protein interaction could be detected in the presence of ADP and ATP, but not when ATP and 2-OG were combined (Fig. 2A).

To further investigate the effect of 2-OG on the interaction, an assay was carried out in the presence of ATP and different concentrations of 2-OG (Fig. 2 B). In the presence of 0.01mM of 2-OG, complex formation occurred as in the absence of 2-OG. However, at 0.1mM of 2-OG, protein interaction decreased significantly and 1mM of 2-OG completely prevented GlnK-UmpH interaction. Different concentrations of ADP and ATP were also evaluated. The results show that the UmpH-GlnK interaction can occur without the presence of nucleotides, however, with increasing ATP or ADP concentrations increasing co-precipitation of UmpH with GlnK was obtained (Fig. 2C), suggesting that both nucleotides can stabilize the protein complex.

FIGURE 2. *IN VITRO* COMPLEX FORMATION BETWEEN UmpH AND PII



SOURCE: The author (2024).

SUBTITLE: **A.** Pull-down was performed in the presence of MgCl_2 (5mM) and the indicated effectors ATP, ADP and 2-OG at 1mM. The binding reactions contained His-PII (20 μg) and UmpH (40 μg). Proteins eluted from the Ni^{2+} magnetic beads were analyzed by SDS-PAGE. **B.** Pull-down was performed under fixed concentration of ATP (1 mM) and MgCl_2 (5 mM) and increasing concentrations of 2-OG as indicated. **C.** Pull-down reactions were performed under fixed concentration of MgCl_2 (5mM) and increasing concentrations of ATP or ADP as indicated. The bars in B and C indicate the densitometry analysis of the band corresponding to UmpH in each lane.

Complex formation between UmpH and GlnK were also evaluated under different combinations of ADP, ATP and 2-OG (Fig. S1). The data indicate that 2-OG abrogates complex formation only under a high ATP:ADP ratio. When the ATP:ADP ratio drops while keeping the total ATP + ADP = 1mM, the ability of 2-OG to inhibit UmpH-GlnK complex formation is reduced (Fig. S1). When only ADP is present, 2-OG could not inhibit complex formation as expected (Fig. S1). These data suggest that not only the 2-OG levels but also the ATP:ADP ratio can affect the interaction between UmpH and GlnK.

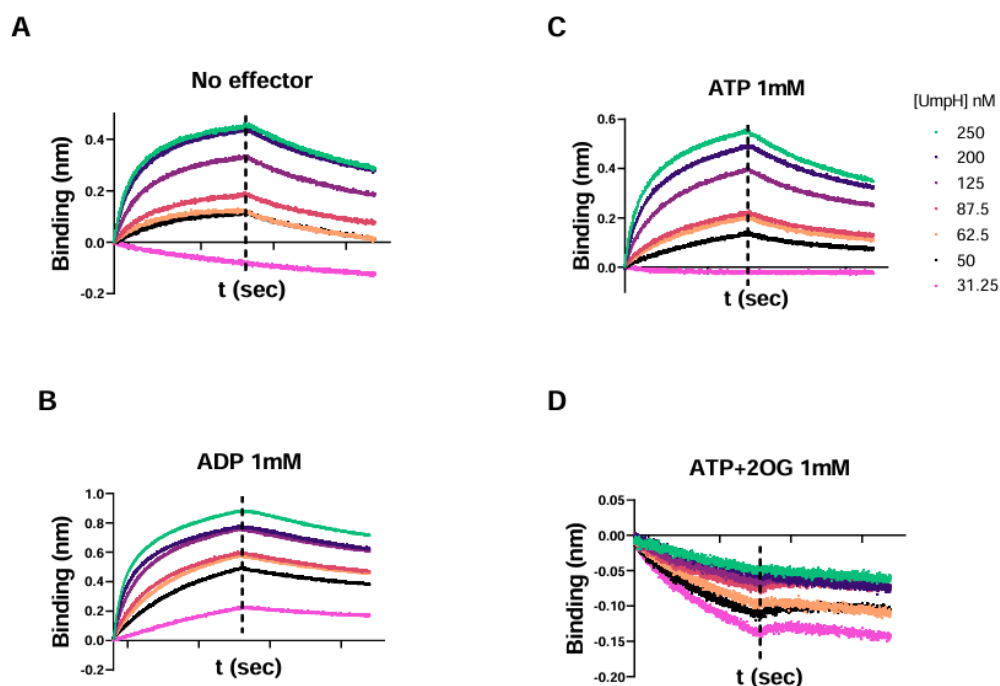
In addition to the control exerted by the allosteric effectors ATP, ADP and 2-OG, the GlnK activity is also modulated by reversible uridylylation. We obtained fully uridylylated GlnK and challenged this preparation to interact with UmpH under different combinations of the allosteric effectors, unmodified GlnK was used in parallel as positive control. The data shown in Fig. S2 indicate that GlnK-UMP₃ does not interact with UmpH at any combination of effector molecules present.

To obtain structural insights into the selective basis of the interaction between UmpH and GlnK, we performed pull-down assays with orthologous PII, GlnZ and GlnB, from the α -Proteobacterium *A. brasiliense* (GlnZAb and GlnBAb). Interestingly, UmpH was able to interact with both *A. brasiliense* PII, GlnZAb and GlnBAb (Fig. S3A). The high sequence and structural similarities among the different PII suggest that the positions which are unique to the GlnBEc sequence (the only PII that did not interact with UmpH) could form the UmpH binding site.

An alignment of the GlnKEc, GlnBEc, GlnZAb and GlnBAb sequences showed that residues unique to GlnBEc are mostly concentrated between residues 69 and 82 (Fig. S4A). Among these candidate positions, surface exposed residues were mapped to the GlnKEc structure (Fig. S4B). This analysis suggests that, differently from most of the PII-target complex known to date, the lateral face of the PII monomers could act as the UmpH binding site (Fig. S4B). As a proof of concept, UmpH was able to interact with a GlnKAb variant carrying a deletion on the T-loop region (GlnZ Δ 42-54) (Fig. S3B). However, the GlnZ Δ 42-54 - UmpH complex was not negatively regulated by 2-OG (Fig. S3B). These data support that even though the T-loop is not required for the PII-UmpH interaction, it plays a role in the response of the PII-UmpH complex to the 2-OG levels (Fig. S3B).

The kinetic parameters of the interaction between UmpH and GlnK were assessed using biolayer interferometry (BLI). His tagged GlnK was immobilized onto a nickel sensor and challenged with UmpH under different effector conditions. The formation of the UmpH-GlnK complex could be detected in the absence of allosteric effector and in the presence of ADP or ATP but not when ATP and 2-OG were combined (Fig. 3). The affinity of the UmpH-GlnK complex was high in the presence of ADP with an equilibrium dissociation constant $K_d = 7.8 \text{ nM} \pm 0.05$ (Fig. 3). The binding affinity were $37.3 \text{ nM} \pm 0.21$ and $50.6 \text{ nM} \pm 0.77$, in the presence of ATP or without effectors, respectively (Fig. 3).

FIGURE 3. BIOLAYER INTERFEROMETRY (BLI) ASSAYS OF THE UMPH GlnK COMPLEX



SOURCE: The author (2024).

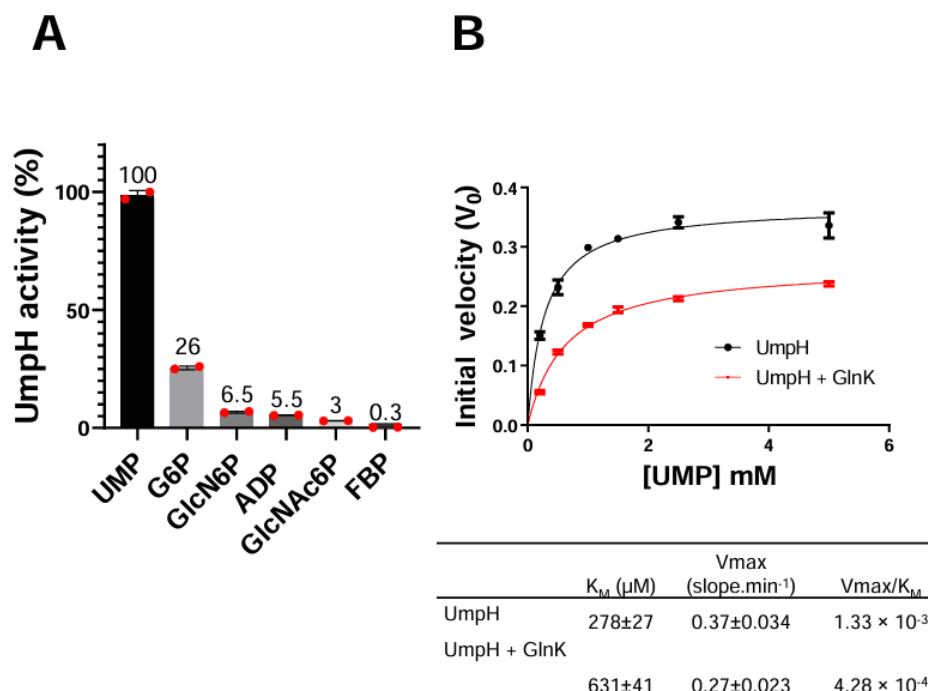
SUBTITLE: The purified His-GlnK was mobilized onto a Ni-NTA Biosensor and the tip was dipped into a solution containing the indicated concentrations of UmpH to record the association curve. The sensor was dipped in buffer without UmpH to monitor complex dissociation, indicated as the time interval after the vertical dashed lines on each graph. Data was recorded in duplicates and analyzed with the Octet Data Analysis software (Fortébio). The buffers contained no effector (A), 1 mM ADP (B), 1mM ATP (C) or 1mM ATP + 2-OG (D).

4.3 GLNK INHIBITS THE PHOSPHATASE ACTIVITY OF UMPH

After confirming the UmpH-GlnK interaction *in vitro*, we hypothesized that GlnK could act to control the enzymatic activity of UmpH. Hence, the activity of UmpH was determined *in vitro* by continuously measuring the phosphate release. Previous studies indicated that even though UmpH can act as a phosphatase over different substrates, both *in vitro* and *in vivo* analysis support that uridine 5'-monophosphate (UMP) is the physiological relevant substrate (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006; Reaves *et al.*, 2013). Indeed, UmpH was more active with UMP as substrate as compared to phospho-sugars such as glucose-6-phosphate (G6P), glucosamine 6-phosphate (GlcN6P), N-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) and fructose 1,6-biphosphate (FBP) when these substrates were at 1 mM (Fig. 4A). ATP and ADP were also tested as potential substrates for UmpH activity since they

were used in some experiments as GlnK effectors. While UmpH showed minor activity using ADP as substrate (Fig. 4A), no UmpH activity could be detected using ATP 1mM (data not shown).

FIGURE 4. *IN VITRO* ACTIVITY OF UmpH



SOURCE: The author (2024).

SUBTITLE: **A.** Different phospho substrates were tested as UmpH substrate at 1mM. The activity of UmpH using the different substrates was plotted as the percentage of the activity using UMP as a reference.

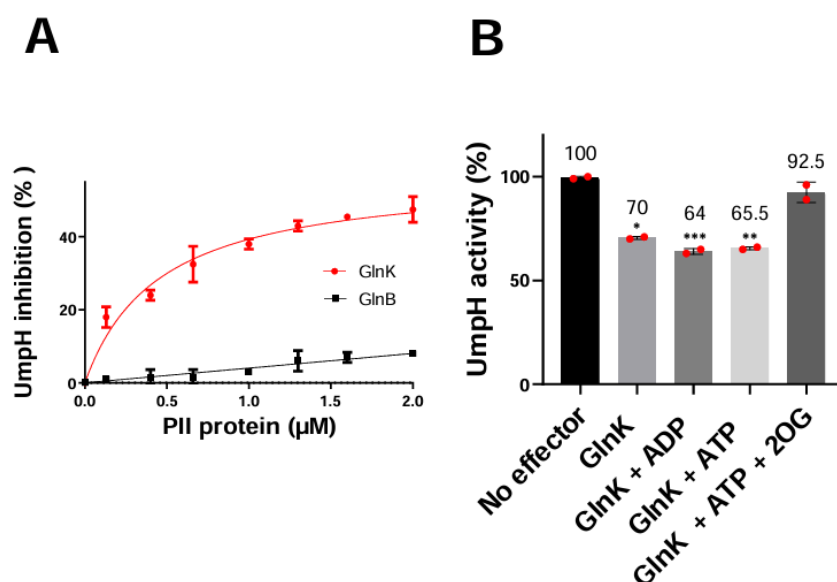
UMP, uridine 5-monophosphate; G6P, glucose-6-phosphate; GlcN6P, glucosamine 6-phosphate; ADP, adenosine di-phosphate; GlcNAc6P, N-acetylglucosamine 6-phosphate; FBP, fructose 1,6-biphosphate. The errors bars and the data points are indicated at the top of each bar. Individual points from each reaction are shown as red balls at the top of each bar. **B.** Kinetic analysis of UmpH. Initial velocities (V_0) were measured using 0.56 μM of UmpH monomer and different concentrations of UMP. The red line was obtained in the presence of 2 μM GlnK (trimer concentration). Reactions were performed in the absence of GlnK effectors. The kinetic parameters are indicated in the table with errors.

Kinetic parameters were obtained assaying UmpH activity under different UMP concentrations in the absence and presence of GlnK. The UmpH enzyme showed a typical hyperbolic V_0 vs UMP concentration curve. Fitting the experimental data into the Michaelis-Menten equation resulted in an $K_M = 278 \pm 27 \mu\text{M}$, which is close to the value determined in a previous study of $160 \pm 38 \mu\text{M}$ (Tremblay; Dunaway-Mariano; Allen, 2006). The presence of GlnK, altered the kinetic parameters of the UmpH

reaction, the K_M for UMP increased 2.3x, reaching $631 \pm 41 \mu\text{M}$ while the V_{max} decreased about 30%, (Fig.4B). The overall UmpH catalytic efficiency (V_{max}/K_M) decreased 68% in the presence of GlnK (Fig.4B). This data support that, when complexed to GlnK, UmpH altered its kinetic parameters reducing its affinity for UMP.

The negative effect of GlnK over UmpH activity was dose dependent. Increasing the amount of GlnK augmented the inhibition of UmpH activity, with a maximum inhibition of UmpH activity of approximately 50% being reached at a molar ratio of UmpH monomer: GlnK trimer of 0.56:2 μM (Fig.5A). Addition of GlnB, which cannot interact with UmpH (Fig. 2A), produced negligible effect over UmpH activity (Fig. 5A).

FIGURE 5. INHIBITION OF UmpH ENZYMATIC ACTIVITY BY GlnK



SOURCE: The author (2024).

SUBTITLE: A. The reactions were performed using 0.5 mM of UMP as UmpH substrate and 0.1 mM ADP as GlnK effector. Reactions contained 0.56 μM of UmpH and the indicated trimer concentrations of GlnK (red line) or GlnB (black line). The data is represented as a percentage of inhibition using a reaction without PII as reference. **B.** The reactions were performed using UMP 0.5 mM as UmpH substrate and in the presence of 1 mM of the indicated GlnK effectors. Reactions contained 0.3 μg of UmpH and 5 μg of GlnK (if indicated). The reaction containing only UmpH (black bar) was set as a reference of 100% activity. Mean values $\pm$ SD were compared using one-way ANOVA. Significant values of $p = 0.0003$, 0.0002 and 0.0001 are indicated by *, **, and ***, respectively. The errors bars and the data points are indicated at the top of each bar. Individual points from each reaction are shown as red balls at the top of each bar.

The UmpH activity was measured in presence of GlnK and different PII allosteric effectors (all at 1mM) using UMP at 0.5 mM, which is close to the K_M of the enzyme. GlnK was able to inhibit UmpH activity ($p<0.05$) only under conditions where the GlnK-UmpH complex formation was observed: in the presence of ADP or ATP, or in the absence of effectors, but not when ATP and 2-OG were combined (Fig. 5B). This assay was also performed at lower concentrations of the GlnK effectors (0.1 mM), the same profile observed (Fig. S5). These data support that UmpH activity is negatively regulated by interaction with GlnK.

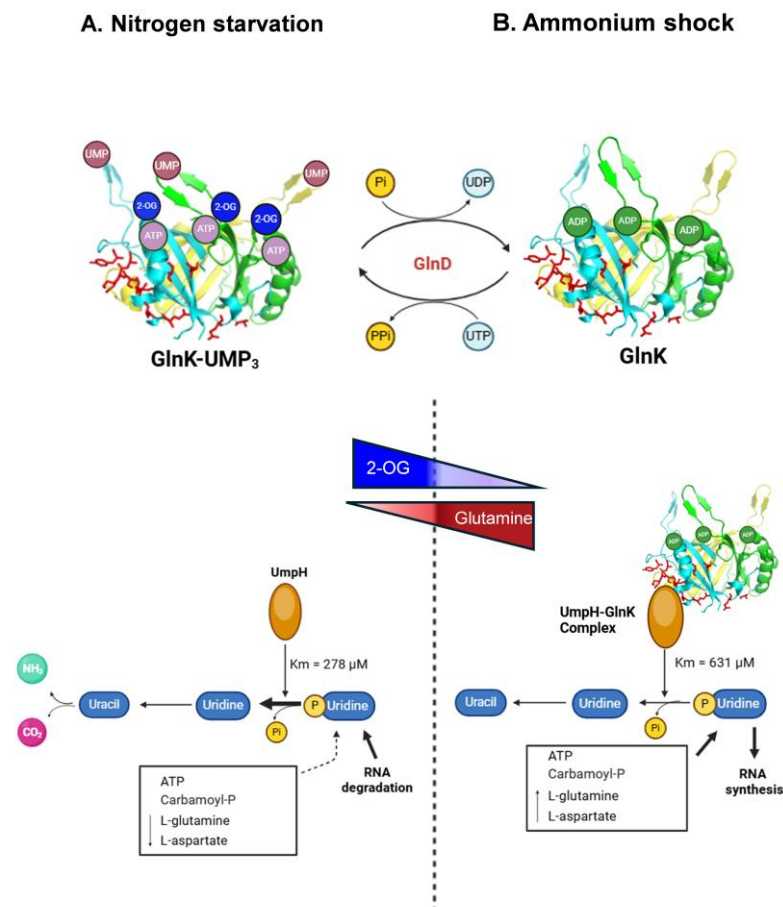
5 DISCUSSÃO

In prokaryotes, nucleotides not only act as important energy metabolites in various cellular processes but also as building blocks for nucleic acid RNA and DNA production (Ding *et al.*, 2021). Conversely, under starvation conditions, nucleotides from the environment or from degrading nucleic acids can be feed into catabolic pathways (Vogels; Drift, 1976). Therefore, nucleotide biosynthetic and degradation pathways must be tuned not only to avoid futile cycles but also to pace the flow-through in each of these pathways accordingly to the availability of nutrients such as carbon, nitrogen and energy sources (Brauer *et al.*, 2006). Fine tuning nucleotide metabolism is likely to be important for fitness in bacteria which experiences fast and famine cycles such as *E. coli* (Zhu; Dai, 2023).

Despite the wealth of data regarding the regulation of nucleotide biosynthetic pathways, the regulation of nucleotide degradation pathways came into focus of research only in recent years. Regulation of nucleotide degradation may occur at the transcriptional level. For instance, in the uracil degradation pathway, the RutR repressor dissociates from its operator sites in the presence of uracil allowing the transcription of uracil degrading genes (Loh *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2007). Analysis of absolute metabolite levels in *E. coli* suggest that nucleotide degrading enzyme are regulated by substrate availability as the K_M of the degrading enzymes typically feel short the substrate concentrations during steady state growth conditions (Bennett *et al.*, 2009). This seems to be the case of UmpH which exhibits a K_M for UMP of 278 μ M in contrast to the determined UMP intracellular concentration of 52 μ M during steady state grow conditions (Reaves *et al.*, 2013).

Here we used ligand fishing assays to identify UmpH as a novel target of PII signaling protein GlnK. The interaction is specific for GlnK, as no interaction could be detected with the paralogue protein GlnB. As GlnK is induced under nitrogen starvation, it is expected that the UmpH-GlnK interaction could play a role during nitrogen starvation and/or during the transition from N-starvation to N-sufficiency. Biochemical analysis and structural modelling showed that the GlnK-UmpH interaction is abrogated when GlnK is uridylylated or bound to Mg.ATP and 2-OG (Fig. 2A, Fig. 3D, Fig. S2). When nitrogen-starved cells encounter nitrogen sources, GlnK gets rapidly deuridylylated and interacts avidly with UmpH. Therefore, the GlnK-UmpH complex is expected to form after an ammonium shock, conditions where the intracellular L-glutamine rises favoring GlnK de-uridylylation, and the levels of 2-OG drop favoring the allosteric binding of ADP to GlnK (Fig. 6B). The formation of the UmpH-GlnK complex increases the UmpH K_M for UMP and thus UmpH activity after the transition from N-starvation to N-sufficiency conditions (Fig. 6B).

FIGURE 6. REGULATORY MODEL OF UMPH ACTIVITY BY GlnK



SOURCE: The author (2024).

SUBTITLE: **A.** Under nitrogen starvation, GlnK is fully uridylylated and cannot interact with UmpH which is active. Degradation of UMP can fill the *rut* uridine catabolic pathway which is induced under nitrogen starvation. The degradation of unused RNAs could act as a source of UMP for UmpH activity. **B.** Upon an ammonium shock, the L-glutamine levels rise and the 2-OG levels drop. GlnK is rapidly de-uridylylated and bound to ADP. This condition promotes the interaction between GlnK and UmpH reducing the enzyme activity and UMP degradation. At the same time, increased L-glutamine and L-aspartate will favor UMP biosynthesis. This regulatory mechanism could help the cells to rapidly switch from a catabolic to an anabolic state in response to ammonium availability in the medium.

Nitrogen starvation reduces the availability of L-glutamine and L-aspartate (Yuan *et al.*, 2009; Ikeda; Shauger; Kustu, 1996), which are precursors used for both protein and nucleotide biosynthesis, that including UMP (Fig. 6A). During nitrogen starvation, the lack of amino acids triggers the stringent response reducing stable RNA (rRNA, tRNA) production (Mohanty; Kushner, 2022). At the same time, starvation promotes RNA degradation which is likely to increase the levels of UMP to feed UmpH activity (Cohen; Kaplan, 1977). The uridine nucleoside produced by UmpH can be recycled into ammonium through the *rut* pathway (Reaves *et al.*, 2013; Loh *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010). It has been suggested that the ammonium derived from different catabolic pathways, that including *rut*, may act as a nitrogen source to maintain a minimal rate of protein biosynthesis under N-starvation (Fig. 6A) (Zimmer *et al.*, 2000; Sanchuki *et al.*, 2017).

When nitrogen starved cells find ammonium in the external medium, the cells should rapidly switch from a catabolic to an anabolic state. The increase in L-glutamine and L-aspartate is likely to enhance UMP biosynthesis (Fig. 6B). However, instead of feeding the *rut* catabolic pathway, the nucleotide should now fill biosynthetic routes such as RNA biosynthesis (Fig. 6B). The formation of the UmpH-GlnK complex under this condition would reduce the affinity of UmpH for UMP, acting as a valve to switch the fate of UMP from degradation to biosynthesis (Fig. 6B).

Quite remarkably, the *rut* pathway is also under the control of PII protein signaling (Jiang; Ninfa, 1999). The *rut* genes are induced under N-starvation by the action of a sigma 54 promoter activated by NtrC (Zimmer *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 1991). Hence, PII proteins participate in the control of the *rut* catabolic pathway at three levels: 1) Regulating the availability of the initial substrate uridine by controlling UmpH activity; 2) Regulating the availability of uridine which controls the RutR repressor; 3) Regulating *rut* genes expression by controlling the activity of NtrC.

In summary, here we identified UmpH as a novel target of the GlnK signaling protein in *E. coli*. We suggest a model where GlnK will interact with UmpH during the transition from N-starvation to N-sufficient conditions, helping the cells to rapidly reprogram its metabolism from a catabolic to an anabolic state to avoid futile cycling of key nutrients.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo, podemos ver o papel das proteínas PII no funcionamento integrado do metabolismo de *E. coli*, corroborando com dados anteriores do papel central de PII no metabolismo bacteriano. Com isso, foi visto que a proteína sinalizadora GlnK de *E. coli* age como um regulador alostérico negativo na atividade da enzima UmpH, envolvida na homeostase da via *de novo* de nucleotídeos pirimidina, demonstrando a versatilidade de PII na regulação e coordenação de diferentes vias metabólicas. A interação entre UmpH e PII parece ocorrer no estado em que a célula está com bom aporte de nutrientes e possui baixos níveis de 2-OG, sendo assim, PII estará na sua forma nativa sem modificações e predominantemente ligada a ADP e a formação do complexo seria possível. Foi visto ainda que quanto maior a concentração de GlnK, maior será a inibição da atividade de UmpH. Esse cenário metabólico pode ocorrer na natureza a partir de um choque de amônio, onde uma grande quantidade de nitrogênio fica disponível de forma rápida para a célula, onde nesse caso, os níveis de 2-OG caem rapidamente e o nível de expressão de GlnK diminui, mas a proteína ainda se mantém em alta concentração na célula. Com isso, poderia ocorrer a interação entre GlnK e UmpH e a diminuição na atividade fosfatase, como mecanismo de adequação do metabolismo bacteriano do estado catabólico para o anabólico ao receber grandes quantidades de nitrogênio em um curto tempo. Isso pode ser interpretado como um possível mecanismo de sobrevivência bacteriano, pois a rápida resposta a mudança de ambientes e nutrientes exerce enorme impacto na viabilidade celular.

7 MEMORIAL DAS ICHS E DO PA

As Interações Culturais e Humanísticas (ICHs) desenvolvidas por mim durante o curso, foram de extrema importância para minha formação pessoal e acadêmica. O espaço que as ICHs proporcionaram, além de serem de aprendizado intelectual, também foram de muita troca pessoal, no qual pude conhecer e interagir com pessoas de cursos, idades, classes sociais e realidades distintas, o que ajudou a me moldar como pessoa e enxergar diferentes vivências. Durante minha trajetória, participei de ICHs variadas, desde ICHs sobre COVID-19 e prática em excel até ICHs de meditação, yoga e LIBRAS. Por isso destaco o quão diversas e importantes são as ICHs para a formação dos alunos, por propiciar a possibilidade de viver experiências únicas.

O Projeto de Aprendizagem (PA) teve um grande impacto na minha formação acadêmica e no posterior desenvolvimento de projetos, começando pelos três primeiros semestres, com a introdução à universidade e à pesquisa científica, no qual pude conhecer diversas pesquisas, suas possibilidades e me introduzir na escrita e pesquisa científica. Nos semestres seguintes de PA, pude realmente experimentar a pesquisa científica, na qual me envolvi no desenvolvimento de teste diagnóstico para COVID-19 no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Setor Litoral sob orientação do prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo. Este foi meu primeiro contato com a pesquisa científica e levo com muito carinho o enorme aprendizado que tive, que influenciou o presente trabalho e influenciará os próximos. O PA me assegurou um espaço fundamental para aprender, treinar e errar, onde pude me desenvolver e me dedicar apenas àquilo para além da sala de aula.

A partir das minhas vivências nas ICHs e no PA durante a graduação, concluo que ambos foram cruciais, cada um com um objetivo diferente e que me permitiram adquirir habilidades diferentes, mas que juntos somaram para a minha formação.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, Karen N.; DUNAWAY-MARIANO, Debra. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 29, n. 9, p. 495-503, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2004.07.008>.
- ARAUJO, Mariana s *et al.* In vitro uridylylation of the Azospirillum brasilense N-signal transducing GlnZ protein. **Protein Expression And Purification**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 19-24, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2003.08.024>.
- ARCONDÉGUY, Tania; JACK, Rachael; MERRICK, Mike. PIISignal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 80-105, mar. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.65.1.80-105.2001>.
- BENNETT, Bryson D *et al.* Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 593-599, 28 jun. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.186>.
- BERG, Jim; HUNG, Yin Pun; YELLEN, Gary. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP: adp ratio. **Nature Methods**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 161-166, 4 jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1288>.
- BIANCHI, Vera; SPYCHALA, Jozef. Mammalian 5'-Nucleotidases. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 278, n. 47, p. 46195-46198, nov. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r300032200>.
- BLAUWKAMP, Timothy A.; NINFA, Alexander J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of Escherichia coli: survival of nitrogen starvation. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 203-214, out. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03153.x>.
- BONATTO, Ana C. *et al.* Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from Herbaspirillum seropedicae. **Protein Expression And Purification**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 293-299, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2007.04.012>.
- BRAUER, Matthew J. *et al.* Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 51, p. 19302-19307, 19 dez. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0609508103>.
- CARR, P. D. *et al.* X-ray structure of the signal transduction protein from Escherichia coli at 1.9 Å. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 93-104, 1 jan. 1996. International Union of Crystallography (IUCr). <http://dx.doi.org/10.1107/s09074444995007293>.

CHEAH, Eong *et al.* Structure of the Escherichia coli signal transducing protein PII. **Structure**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 981-990, out. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(94\)00100-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(94)00100-6).

CHEN, Hai-Lin *et al.* Biosensors-Based In Vivo Quantification of 2-Oxoglutarate in Cyanobacteria and Proteobacteria. **Life**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 51, 27 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life8040051>.

CHUBUKOV, Victor *et al.* Coordination of microbial metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 327-340, 24 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3238>.

COHEN, L; KAPLAN, R. Accumulation of nucleotides by starved Escherichia coli cells as a probe for the involvement of ribonucleases in ribonucleic acid degradation. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 129, n. 2, p. 651-657, fev. 1977. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.129.2.651-657.1977>.

CONROY, Matthew J. *et al.* The crystal structure of the Escherichia coli AmtB–GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 4, p. 1213-1218, 23 jan. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610348104>.

COUTTS, G. *et al.* Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 536-545, 15 fev. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/21.4.536>.

COX, Jürgen; MANN, Matthias. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 12, p. 1367-1372, 30 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1511>.

DING, Ting *et al.* Nucleotides as optimal candidates for essential nutrients in living organisms: a review. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 82, p. 104498, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2021.104498>.

DURAND, Anne; MERRICK, Mike. In Vitro Analysis of the Escherichia coli AmtB–GlnK Complex Reveals a Stoichiometric Interaction and Sensitivity to ATP and 2-Oxoglutarate. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 281, n. 40, p. 29558-29567, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m602477200>.

ENGLEMAN, Edgar G.; FRANCIS, Sharron H.. Cascade control of E. coli glutamine synthetase. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 191, n. 2, p. 602-612, dez. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90398-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(78)90398-3).

FOKINA, Oleksandra *et al.* Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the Synechococcus elongatus P II signal transduction protein. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 46, p. 19760-19765, nov. 2010.

Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007653107>.

FORCHHAMMER, Karl. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 65-72, fev. 2008. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.11.004>.

GERHARDT, Edileusa C.M. *et al.* The Bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 95, n. 6, p. 1025-1035, 30 jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12912>.

GERHARDT, Edileusa C. M. *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**, [S.L.], v. 5, n. 6, 22 dez. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00817-20>.

GONCHEVA, Mariya I.; FLANNAGAN, Ronald S.; HEINRICHS, David E.. De Novo Purine Biosynthesis Is Required for Intracellular Growth of *Staphylococcus aureus* and for the Hypervirulence Phenotype of a *purR* Mutant. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 88, n. 5, 20 abr. 2020. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/iai.00104-20>.

GONCHEVA, Mariya I.; CHIN, Denny; HEINRICHS, David E.. Nucleotide biosynthesis: the base of bacterial pathogenesis. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 30, n. 8, p. 793-804, ago. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2021.12.007>.

GONÇALVES, Ana Carolina Aparecida *et al.* The activity of the ribonucleotide monophosphatase UmpH is controlled by interaction with the GlnK signaling protein in *Escherichia coli*. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 300, n. 12, p. 107931, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107931>.

GRAVINA, Fernanda *et al.* Proteome analysis of an *Escherichia coli* *ptsN* -null strain under different nitrogen regimes. **Journal Of Proteomics**, [S.L.], v. 174, p. 28-35, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.006>.

HUERGO, Luciano F. *et al.* Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 6, p. 1523-1535, 19 nov. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06016.x>.

HUERGO, Luciano F. *et al.* Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 308, n. 1, p. 40-47, 14 abr. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01986.x>.

HUERGO, Luciano F. *et al.* PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, [S.L.], v. 158, n. 1, p. 176-190, 1 jan. 2012. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.049783-0>.

HUERGO, Luciano F.; CHANDRA, Govind; MERRICK, Mike. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 251-283, mar. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00351.x>.

HUERGO, Luciano F. *et al.* Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies. **Acs Sensors**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 703-708, 26 jan. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssensors.0c02544>.

HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com Azospirillum brasilense**: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p.

IKEDA, Timothy P.; SHAUGER, Andrea E.; KUSTU, Sydney. Salmonella typhimurium Apparently Perceives External Nitrogen Limitation as Internal Glutamine Limitation. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 259, n. 4, p. 589-607, jun. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0342>.

JAGGI, Rene *et al.* The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from Escherichia coli. **Febs Letters**, [S.L.], v. 391, n. 1-2, p. 223-228, 5 ago. 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00737-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(96)00737-5).

JAVELLE, Arnaud *et al.* Ammonium Sensing in Escherichia coli. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 279, n. 10, p. 8530-8538, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m312399200>.

JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 170-172, 1 fev. 2005. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0330170>.

JIANG, P *et al.* Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of Escherichia coli: genetic separation of interactions with protein receptors. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 179, n. 13, p. 4342-4353, jul. 1997. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.179.13.4342-4353.1997>.

JIANG, Peng; NINFA, Alexander J.. Regulation of Autophosphorylation of Escherichia coli Nitrogen Regulator II by the PII Signal Transduction Protein. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 181, n. 6, p. 1906-1911, 15 mar. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.181.6.1906-1911.1999>.

JIANG, Peng; PIOSZAK, Augen A.; NINFA, Alexander J.. Structure-Function Analysis of Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of Escherichia coli. **Biochemistry**, [S.L.], v. 46, n. 13, p. 4117-4132, 14 mar. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi0620508>.

JIANG, P; ZUCKER, P; NINFA, A J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 179, n.

13, p. 4354-4360, jul. 1997. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jb.179.13.4354-4360.1997>.

KAMBEROV, ES *et al.* Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Cellular & molecular biology research**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 175–191, 1994. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7874194/>

KILSTRUP, Mogens *et al.* Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 555-590, ago. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.006>.

KOCH, Moritz *et al.* Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator *pirC*. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01491-1>.

KUZNETSOVA, Ekaterina *et al.* Genome-wide Analysis of Substrate Specificities of the *Escherichia coli* Haloacid Dehalogenase-like Phosphatase Family. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 281, n. 47, p. 36149-36161, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m605449200>.

LOFFLER, M *et al.* Pyrimidine pathways in health and disease. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 430-437, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2005.07.003>.

LOH, Kevin D. *et al.* A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 13, p. 5114-5119, 15 mar. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600521103>.

LÜDDECKE, Jan; FORCHHAMMER, Karl. From PII Signaling to Metabolite Sensing: a novel 2-oxoglutarate sensor that details *pii* - *nagK* complex formation. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 83181, 12 dez. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083181>.

LÜDDECKE, Jan *et al.* PII Protein-Derived FRET Sensors for Quantification and Live-Cell Imaging of 2-Oxoglutarate. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, 3 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01440-w>.

MAIER, Sarah *et al.* Mechanism of Disruption of the Amt-GlnK Complex by PII-Mediated Sensing of 2-Oxoglutarate. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 26327, 19 out. 2011. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026327>.

MERRICK, Mike. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 5, 6 jan. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00763>.

MERRICK, M J; A EDWARDS, R. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 604-622, dez. 1995. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mr.59.4.604-622.1995>.

MOHANTY, Bijoy K.; KUSHNER, Sidney R.. Regulation of mRNA decay in *E. coli*. **Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 48-72, 21 set. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10409238.2021.1968784>.

MOURE, Vivian R. *et al.* Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression And Purification**, [S.L.], v. 81, n. 1, p. 83-88, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.008>.

NINFA, Elizabeth G *et al.* Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 175, n. 21, p. 7024-7032, nov. 1993. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.175.21.7024-7032.1993>.

NINFA, Alexander J; JIANG, Peng. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 168-173, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.011>.

ORTHWEIN, Tim *et al.* The novel P II -interactor PirC identifies phosphoglycerate mutase as key control point of carbon storage metabolism in cyanobacteria. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 118, n. 6, fev. 2021. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2019988118>.

PERI, Krishna G.; GOLDIE, Hughes; WAYGOOD, E. Bruce. Cloning and characterization of the N-acetylglucosamine operon of *Escherichia coli*. **Biochemistry And Cell Biology**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 123-137, 1 jan. 1990. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o90-017>.

PLUMBRIDGE, J. A.. Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 505-515, abr. 1989. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00197.x>.

POPA, Marius Stelian; FRONE, Adriana Nicoleta; PANAITESCU, Denis Mihaela. Polyhydroxybutyrate blends: a solution for biodegradable packaging?. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 207, p. 263-277, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.185>.

PROUDFOOT, Michael *et al.* General Enzymatic Screens Identify Three New Nucleotidases in *Escherichia coli*. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 279, n. 52, p. 54687-54694, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m411023200>.

RADCHENKO, M. V., Thornton, J., & Merrick, M. (2010). Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate. **The Journal of biological chemistry**, 285(40), 31037–31045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.153908>.

REAVES, Marshall Louis *et al.* Pyrimidine homeostasis is accomplished by directed overflow metabolism. **Nature**, [S.L.], v. 500, n. 7461, p. 237-241, 31 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12445>.

RODIONOVA, Irina A. *et al.* The Nitrogen Regulatory PII Protein (GlnB) and N - Acetylglucosamine 6-Phosphate Epimerase (NanE) Allosterically Activate Glucosamine 6-Phosphate Deaminase (NagB) in Escherichia coli. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 200, n. 5, mar. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00691-17>.

RODRIGUES, Thiago E. *et al.* Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 91, n. 4, p. 751-761, 6 jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12493>.

RODRIGUES, Thiago Estefano *et al.* Fatty acid biosynthesis is enhanced in Escherichia coli strains with deletion in genes encoding the PII signaling proteins. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 201, n. 2, p. 209-214, 30 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-018-1603-2>.

SANCHUKI, Heloisa B.s. *et al.* Dynamics of the Escherichia coli proteome in response to nitrogen starvation and entry into the stationary phase. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1865, n. 3, p. 344-352, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.12.002>.

SANTOS, Adrian Richard Schenberger *et al.* NAD⁺ biosynthesis in bacteria is controlled by global carbon/nitrogen levels via PII signaling. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 295, n. 18, p. 6165-6176, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.ra120.012793>.

SAUSE, William E. *et al.* The purine biosynthesis regulator PurR moonlights as a virulence regulator in Staphylococcus aureus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 116, n. 27, p. 13563-13572, 19 jun. 2019. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1904280116>.

SCHUBERT, Christopher *et al.* L-Aspartate as a high-quality nitrogen source in Escherichia coli: regulation of L :aspartase by the nitrogen regulatory system and interaction of L :aspartase with glnB. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 115, n. 4, p. 526-538, 3 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.14620>.

SHAPIRO, Bennett M. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from Escherichia coli. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 659-670, 1 fev. 1969. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00830a030>

SHIMADA, Tomohiro *et al.* RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 744-757, 19 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05954.x>.

SOUZA, Emanuel Maltempi *et al.* Use of nitrogen-fixing bacteria to improve agricultural productivity. **Bmc Proceedings**, [S.L.], v. 8, n. 4, out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-o23>.

THOMSON, Jessica M.; LAMONT, Iain L.. Nucleoside Analogues as Antibacterial Agents. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 10-11, 22 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00952>.

TREMBLAY, Lee W.; DUNAWAY-MARIANO, Debra; ALLEN, Karen N. Structure and Activity Analyses of Escherichia coli K-12 NagD Provide Insight into the Evolution of Biochemical Function in the Haloalkanoic Acid Dehalogenase Superfamily. **Biochemistry**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 1183-1193, 1 jan. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi051842j>.

TRUAN, Daphne *et al.* A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 400, n. 3, p. 531-539, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.036>.

TURNBOUGH, Charles L.; SWITZER, Robert L.. Regulation of Pyrimidine Biosynthetic Gene Expression in Bacteria: repression without repressors. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 266-300, jun. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.00001-08>.

VAN HEESWIJK, W *et al.* An additional PII in Escherichia coli: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 132, n. 1-2, p. 153-157, out. 1995. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00302-I](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(95)00302-I).

VAN HEESWIJK, Wally C. *et al.* An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 133-146, jul. 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6281349.x>.

VOGELS, G D; DRIFT, C van Der. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. **Bacteriological Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 403-468, jun. 1976. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/br.40.2.403-468.1976>.

WANG, Pan *et al.* Increasing the Ascomycin Yield by Relieving the Inhibition of Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase by the Signal Transduction Protein GlnB. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 26 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.684193>.

WATZER, Björn *et al.* Metabolic pathway engineering using the central signal processor PII. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 14, n. 1, 25 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-015-0384-4>.

WATZER, Björn *et al.* The Signal Transduction Protein PII Controls Ammonium, Nitrate and Urea Uptake in Cyanobacteria. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, 25 jun. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01428>.

WEISS, David S. *et al.* The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. **Cell**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 155-167, out. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90579-n](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90579-n).

XU, Yibin *et al.* GlnK, a PII-homologue: structure reveals atp binding site and indicates how the t-loops may be involved in molecular recognition. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 282, n. 1, p. 149-165, set. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.1979>.

YUAN, Jie *et al.* Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular Systems Biology**, [S.L.], v. 5, n. 1, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2009.60>.

ZHANG, Wenyao *et al.* Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA–NifL System for Nitrogen Fixation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 907, 4 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24020907>.

ZHU, Jiangming *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of l-alanyl-l-glutamine. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, 11 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01369-2>.

ZHU, Manlu; DAI, Xiongfeng. Stringent response ensures the timely adaptation of bacterial growth to nutrient downshift. **Nature Communications**, [S.L.], v. 14, n. 1, 28 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-36254-0>.

ZIMMER, Daniel P. *et al.* Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 97, n. 26, p. 14674-14679, 19 dez. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.26.14674>.

ANEXO 1 – INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

Supporting Information

The activity of the ribonucleotide monophosphatase UmpH is controlled by interaction with the GlnK signaling protein in *Escherichia coli*

Ana Carolina Aparecida Gonçalves¹, Tatiana de Mello Damasco Nunes¹, Erick Parize², Edileusa Cristina Marques Gerhardt², Gustavo Antônio de Souza³, Jörg Scholl⁴, Karl Forchhammer⁴ and Luciano Fernandes Huergo^{1,2*}

From the: ¹Setor Litoral, UFPR Matinhos, PR, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, UFPR Curitiba, PR, Brazil; ³Dept of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil; ⁴Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin der Eberhard-Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, Tübingen 72076, Germany;

Supporting Figures

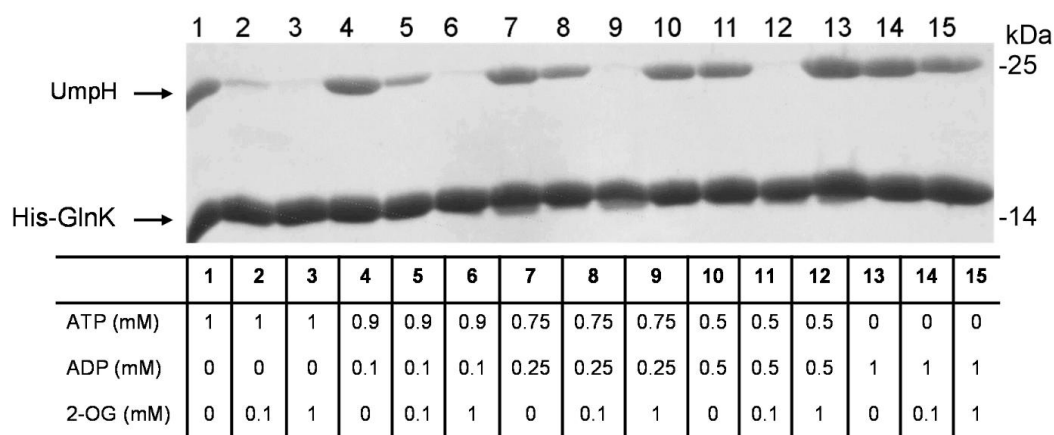


Figure S1. Effect of different concentrations of the effectors on *in vitro* formation of the UmpH-GlnK complex. *In vitro* complex formation between UmpH and GlnK was assessed by pull-down using Ni²⁺ magnetic beads. The binding reactions were performed adding purified His-GlnK (20 µg) and UmpH (40 µg), after extensive washing, proteins were eluted from the beads and analyzed by SDS-PAGE. All buffers contained MgCl₂ and the indicated effectors ATP, ADP and 2-OG.

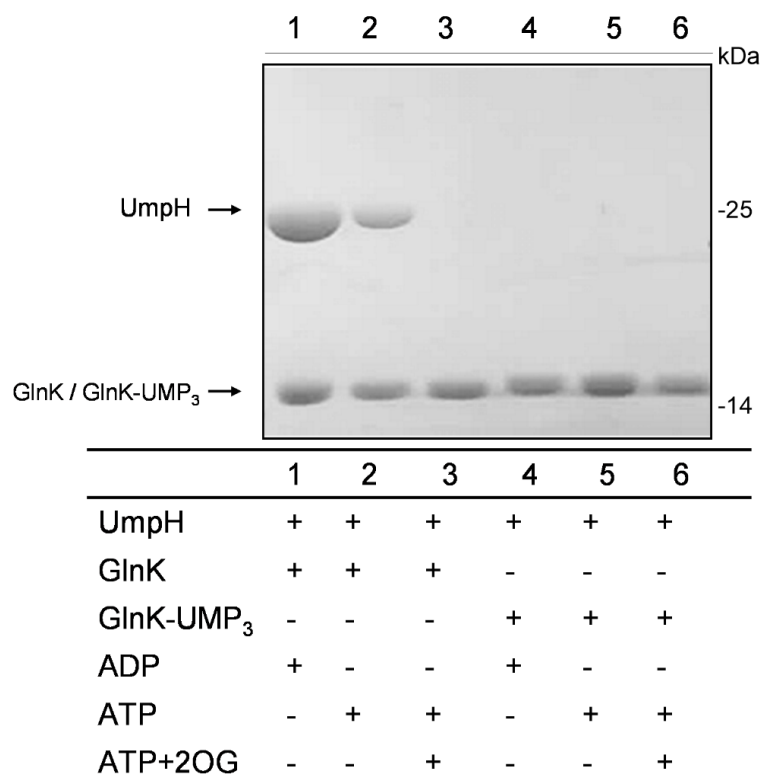


Figure S2. Effect of GlnK uridylation on the interaction with UmpH. *In vitro* complex formation between UmpH and GlnK was assessed by pull-down using Ni²⁺ magnetic beads. The binding reactions were performed adding purified His-GlnK or His-GlnK-UMP₃ (20 µg) and UmpH (40 µg), after extensive washing, proteins were eluted from the beads and analyzed by SDS-PAGE. All buffers contained MgCl₂ and the indicated effectors ATP, ADP and 2-OG at 1mM concentration. The bands corresponding to UmpH and GlnK/GlnK-UMP₃ are indicated by arrows.

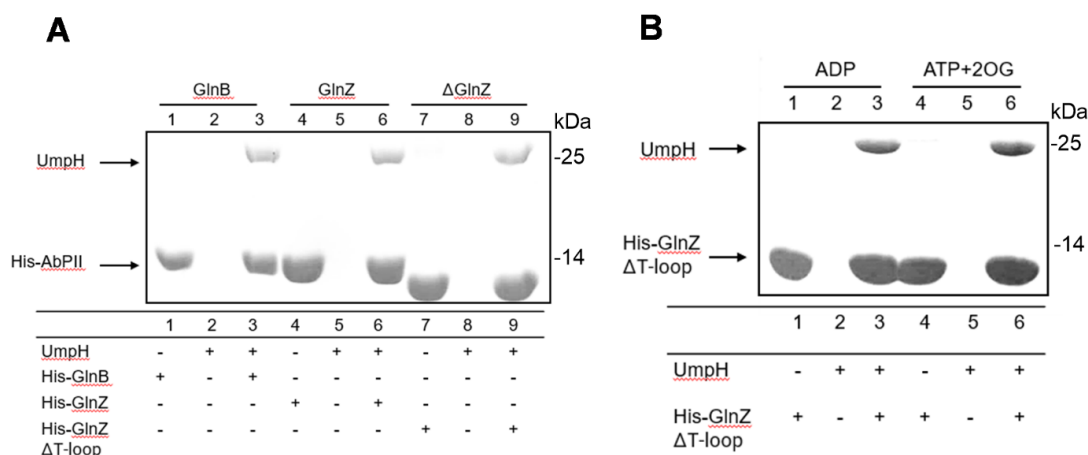


Fig. S3. *In vitro* complex formation between UmpH and PII from *Azospirillum brasilense*. *In vitro* complex formation between UmpH and *A. brasilense* GlnB, GlnZ and GlnZΔT-loop was assessed by pull-down using Ni²⁺ magnetic beads. The binding reactions were performed adding purified His-AbPII (10 μg) and UmpH (20 μg), after extensive washing, proteins were eluted from the beads and analyzed by SDS-PAGE. **A.** All buffers contained MgCl₂ 5mM and ADP at 1mM concentration. The bands corresponding to UmpH and His-AbPII are indicated by arrows. **B.** *In vitro* complex formation between UmpH and GlnZΔT-loop. All buffers contained MgCl₂ 5mM and ADP or ATP plus 2-OG at 1mM concentration. The bands corresponding to UmpH and His- GlnZΔT-loop are indicated by arrows.

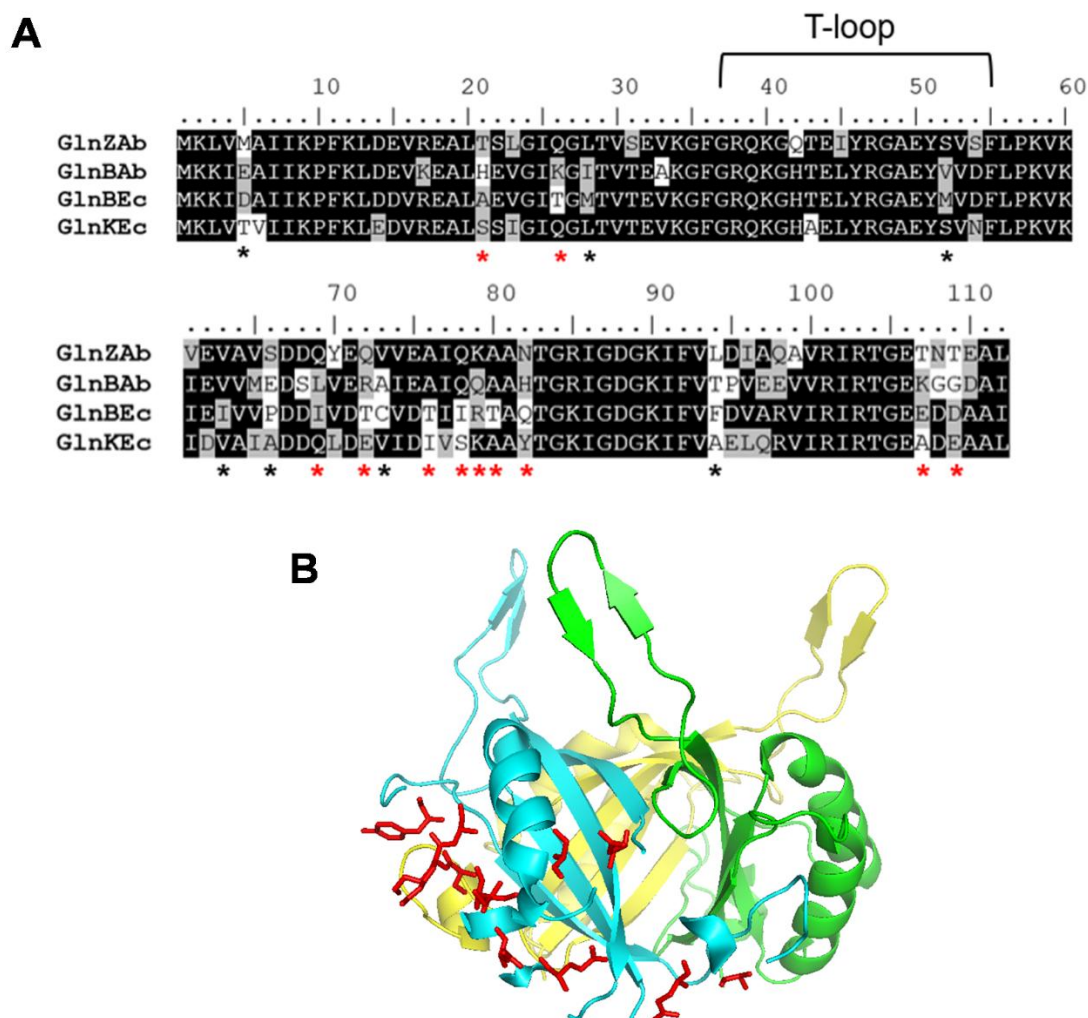


Fig. S4. Putative residues of GlnK involved in contacts with UmpH. **A.** Sequence alignment of PII sequences from *E. coli* (GlnKEc and GlnBEc) and from *A. brasiliense* (GlnZAb and GlnBAb). Identical and similar residues are shaded in black and gray, respectively. The PII T-loop (37-55) is indicated. Residues that are unique to the GlnBEc sequence (the only PII that cannot interact with UmpH) are indicated by * with surface exposed residues marked in red *. **B.** The GlnKEc structure retrieved from the AmtB-GlnK complex (PDB- 2NS1) is presented in cartoon with monomers in yellow, green and cyan. The residues marked in red in the alignment are indicated by red sticks in the

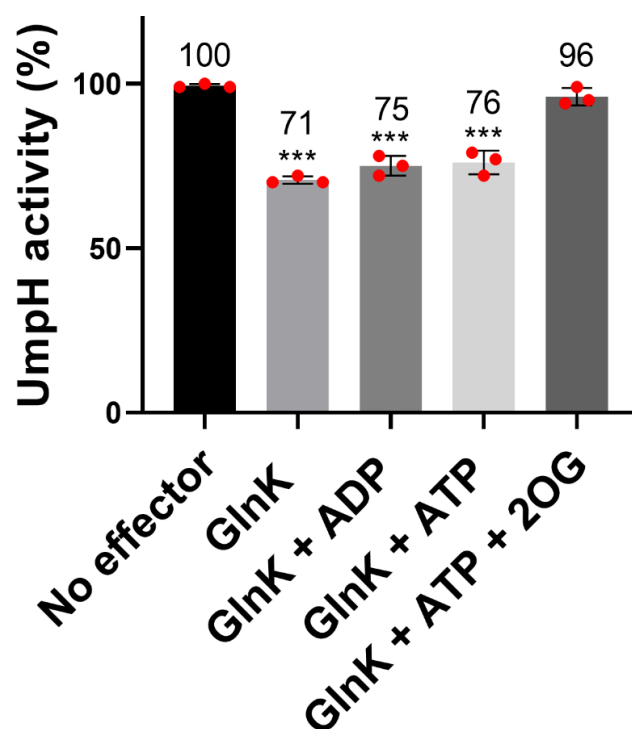


Figure S5. Inhibition of UmpH enzymatic activity by GlnK. The reactions were performed using UMP at 0.5 mM as UmpH substrate and in the presence of 0.1 mM of the indicated GlnK effectors. Reactions contained 300 ng of UmpH and 5 μ g of GlnK (if indicated). The reaction containing only UmpH (black bar) was set as a reference of 100% activity. Mean values $\pm$ SD were compared using one-way ANOVA. Significant values at $p < 0.0001$ are indicated by ***. Individual points from each reaction are shown as red balls on each bar. Individual points from each reaction are shown as red balls on each bar.