

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA NATALIA LOYOLA

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA N-ACETIL-L-GLUTAMATOQUINASE (NAGK) E SUA  
POSSÍVEL INTERAÇÃO COM AS PROTEÍNAS PII (GlnB, GlnZ) EM *Azospirillum*  
*brasiliense*

CURITIBA

2025

JESSICA NATALIA LOYOLA

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA N-ACETIL-L-GLUTAMATOQUINASE (NAGK) E SUA  
POSSÍVEL INTERAÇÃO COM AS PROTEÍNAS PII (GlnB, GlnZ) EM *Azospirillum*  
*brasiliense*

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, do  
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edileusa Cristina Marques  
Gerhardt

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Loyola, Jessica Natalia, 1994-.

Caracterização da enzima N-Acetil-L-Glutamatoquinase (NAGK) e sua possível interação com as proteínas PII (GinB, Ginz) em *Azospirillum brasilense*. / Jessica Natalia Loyola. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Edileusa Cristina Marques Gerhardt.

1. Plantas - Proteínas. 2. *Azospirillum brasilense*. 3. Arginina. 4. Proteínas PII Reguladoras de Nitrogênio. I. Gerhardt, Edileusa Cristina Marques, 1985-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica. III. Título

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JÉSSICA NATÁLIA LOYOLA, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA N-ACETIL-L-GLUTAMATOQUINASE (NAGK) E SUA POSSÍVEL INTERAÇÃO COM AS PROTEÍNAS PII (GlnB, GlnZ) EM *Azospirillum brasilense***, sob orientação da Profa. Dra. EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Agosto de 2025.

Assinatura Eletrônica

14/09/2025 14:26:05.0

EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/09/2025 08:56:25.0

LUCIANO FERNANDES HUERGO

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/09/2025 15:36:04.0

ANA CLAUDIA BONATTO

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## AGRADECIMENTOS

Acredito que nossas conquistas, para não dizer nenhuma, poucas vezes são exclusivamente nossas, pois há sempre pessoas que podem não estar protagonizando, mas foram fundamentais para que o almejado fosse conquistado, e não seria possível sem elas.

Com isso em mente, gostaria primeiramente de agradecer a Deus, pois foi ele quem colocou as pessoas certas em minha vida e que me possibilitou as oportunidades de viver e aprender o que vivi e aprendi durante meu mestrado. Gostaria de agradecer a oportunidade, a paciência, os ensinamentos científicos, os conselhos e boa vontade da minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Edileusa Cristina Marques Gerhardt que tem uma energia única e é apaixonada pelo que faz, inspira seus alunos e colegas com seu bom humor e determinação a buscarem sempre o melhor com a ciência. Por ter acreditado em mim para levar parte de seu projeto para fora do Brasil e ajudado com os custos, uma experiência ímpar para meu mestrado. Ao professor Dr. Emanuel Maltempo de Souza, líder do grupo Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio (NFN) da UFPR por ter me recebido tão bem quando demonstrei interesse em ingressar para o mestrado e me ajudado a encontrar a melhor pessoa a me orientar.

Aos meus colegas da sala 271 e aos ICs, por tornarem meus dias trabalhando mais leves e mais divertidos. Ao Eduardo Campos por ter me recebido e me ajudado com todo o início das técnicas do dia a dia no laboratório que eu ainda não estava familiarizada, e por toda a ajuda científica de protocolos e equipamentos. A Laís Karas por toda a amizade, otimismo e ajuda no laboratório, mesmo enquanto ela também aprendia. A toda a parceria e apoio no lab, nos congressos e na Alemanha durante a capacitação da qual compartilhamos juntas as experiências, aprendizados e viagens de última hora.

Ao professor Dr. Khaled Selim, pela oportunidade e por ter me recebido e tutelado tão bem durante meu período de capacitação na Alemanha em seu laboratório, pela paciência em ensinar os experimentos e processos burocráticos, reuniões esclarecedoras sobre a NAGK e pela boa vontade de ensinar. Ao Eduardo Sabatine, que estava no laboratório fazendo seu doutorado sanduíche e dispôs de seu tempo para me ajudar e ajudar a Laís com nossos experimentos de bancada e interpretação de resultados, compartilhando sua expertise com proteínas conosco e também pela companhia em viagens. A Barbara Nogueira que chegou depois no laboratório para fazer seu doutorado sanduíche e fez amizade de forma espontânea conosco e dividiu experiências de viagens e protocolos enzimáticos.

Aos técnicos Valter Baura por toda a paciência com os equipamentos e por soluções rápidas a meus problemas que eu imaginava mais complexos. A Dona Rose Prado, agora técnica emérita da UFPR, por preparar as soluções e meios com tanto cuidado e qualidade. Por toda a paciência dela com questões de organização minha e dos outros alunos.

Aos demais professores do grupo e do departamento pelas disciplinas e ensinamentos de bioquímica e biologia molecular, professora Dr<sup>a</sup>. Leda Chubatsu pelos ensinamentos e paciência, professora Dr<sup>a</sup>. Guilhermina Noletto, coordenadora da pós-graduação que me ensinou bastante

sobre como o departamento funciona durante meu período de representante discente suplente.

À banca de professores, Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Bonatto pela atenção ao meu trabalho, por chamar atenção a pontos necessários e dicas construtivas.

A minha família, meus pais por ter me incentivado a sempre buscar o melhor através do conhecimento, e muitas vezes serem a base para que hoje eu seja capaz de estar vivendo o sonho de ser mestre e ter a educação superior que eles me diziam que gostariam de ter tido a oportunidade e infelizmente não tiveram. Vocês conseguiram formar sua filha em uma universidade pública de qualidade e agora ela segue no caminho que vocês tanto incentivaram com o mestrado.

Meus mais sinceros agradecimentos

## RESUMO

A alfa-proteobactéria *Azospirillum brasilense* é amplamente estudada e possui relevância econômica devido à sua capacidade de promover o crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio e da produção de fitormônios. Entre as vias envolvidas no destino do nitrogênio fixado, destaca-se a biossíntese de arginina, na qual a N-acetil-L-glutamato quinase (NAGK) catalisa uma etapa regulatória a partir do glutamato em organismos que realizam o ciclo de síntese de ornitina. A arginina é um aminoácido-chave como fonte de nitrogênio, atuando como precursora de poliaminas em *A. brasilense* e da ureia, compostos que podem ser transferidos à planta hospedeira durante a associação. Em microrganismos, a NAGK pode apresentar duas formas estruturais: dimérica, insensível à arginina (como em *E. coli*), e hexamérica, sensível à arginina (como em cianobactérias). Nessa última, a regulação é mediada por proteínas PII, reguladoras e transdutoras de sinal, interação que não ocorre em *E. coli*. Em *A. brasilense*, entretanto, não há dados consolidados sobre a interação entre as PII (GlnB e GlnZ) e a NAGK hexamérica. Considerando a relevância dessa via, o presente trabalho buscou caracterizar a NAGK de *A. brasilense* (AbNAGK) quanto à atividade enzimática, estrutura e interação com as proteínas PII GlnZ e GlnB, além de avaliar a influência de metabólitos e modificações estruturais sobre sua função. Para atingir esses objetivos, a proteína foi purificada com cauda de histidina e também em sua forma nativa, a partir de vetores produzidos em *E. coli*. As proteínas NAGK e PII foram purificadas por cromatografia de afinidade ou troca iônica com subsequente remoção de caudas de histidina quando aplicável. Foram realizados ensaios de interação proteína-proteína (pull-down) fotometria de massas, cinética enzimática e cromatografia por exclusão de tamanho para elucidar o estado oligomérico e possíveis complexos formados. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos de efetores como ATP e 2-oxoglutarato, bem como a sensibilidade à arginina. Os resultados sugerem que a presença da cauda de histidina na porção N-terminal de AbNAGK influencia sua oligomerização, favorecendo a formação de dímeros e alterando a sensibilidade à arginina, em contraste com a enzima nativa que mantém o estado hexamérico típico. As proteínas PII interagem com AbNAGK nativa de forma dependente de efetores, sugerindo um mecanismo de regulação fino em resposta ao estado nitrogenado celular. A análise cinética de NAGK-his indicou valores de  $K_m$  e  $k_{cat}$  acima dos reportados para NAGKs bacterianas, indicando mal funcionamento da enzima nas condições testadas. Desse modo, a partir dos resultados observados, conclui-se que a AbNAGK precisa de sua região N-terminal livre para adotar a conformação hexamérica, condição necessária para a interação com as proteínas PII, observadas aqui na presença do efector ATP, e para a função catalítica da enzima.

**Palavras chave:** Proteínas PII, GlnB, GlnZ, *Azospirillum brasilense*, NAGK, arginina.

## ABSTRACT

The alpha-proteobacterium *Azospirillum brasilense* is widely studied and has economic relevance due to its ability to promote plant growth through biological nitrogen fixation and the production of phytohormones. Among the pathways involved in the fate of fixed nitrogen, arginine biosynthesis stands out, in which N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) catalyzes a regulatory step from glutamate in organisms that perform the ornithine synthesis cycle. Arginine is a key amino acid as a nitrogen source, acting as a precursor of polyamines in *A. brasilense* and of urea, compounds that can be transferred to the host plant during the association. In microorganisms, NAGK can occur in two structural forms: dimeric, insensitive to arginine (as in *E. coli*), and hexameric, arginine-sensitive (as in cyanobacteria). In the latter, regulation is mediated by PII proteins, regulatory and signal-transducing proteins, an interaction that does not occur in *E. coli*. In *A. brasilense*, however, there are no consolidated data on the interaction between PII proteins (GlnB and GlnZ) and the hexameric NAGK. Considering the relevance of this pathway, the present work aimed to characterize *A. brasilense* NAGK (AbNAGK) in terms of enzymatic activity, structure, and interaction with the PII proteins GlnZ and GlnB, as well as to evaluate the influence of metabolites and structural modifications on its function. To achieve these objectives, the protein was purified with a histidine tag and also in its native form, from vectors expressed in *E. coli*. NAGK and PII proteins were purified by affinity or ion-exchange chromatography with subsequent removal of histidine tags when applicable. Protein-protein interaction assays (pull-down), mass spectrometry, enzyme kinetics, and size-exclusion chromatography were performed to elucidate the oligomeric state and possible complexes formed. In addition, the effects of effectors such as ATP and 2-oxoglutarate were evaluated, as well as arginine sensitivity. The results suggest that the presence of the histidine tag at the N-terminal region of AbNAGK influences its oligomerization, favoring dimer formation and altering arginine sensitivity, in contrast to the native enzyme, which maintains the typical hexameric state. The PII proteins interact with native AbNAGK in an effector-dependent manner, suggesting a fine regulatory mechanism in response to the cellular nitrogen status. Kinetic analysis of His-tagged NAGK indicated  $K_m$  and  $k_{cat}$  values higher than those reported for bacterial NAGKs, pointing to malfunctioning of the enzyme under the tested conditions. Thus, based on the observed results, it can be concluded that AbNAGK requires a free N-terminal region to adopt the hexameric conformation, a condition necessary for interaction with PII proteins observed here in the presence of the effector ATP and for the catalytic function of the enzyme.

**Keywords:** PII proteins, GlnB, GlnZ, *Azospirillum brasilense*, NAGK, arginine.

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-Oxoglutarato
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ADP	5' difosfato de adenosina
Amp <sup>r</sup>	Resistência a ampicilina
ATP	5' trifosfato de adenosina
ATase	Adenililtransferase
AST	Arginina Succinil Transferase
BCCP	<i>Biotin Carboxyl Carrier Protein</i>
BSA	Albumina bovina
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO <sub>600</sub>	Densidade óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
DraG	Dinitrogenase redutase glicohidrolase
GDH	Glutamato desidrogenase
GlnD	Uridililtransferase
GlnB-his	Proteína GlnB com cauda de histidina
GlnB-wt	Proteína GlnB <i>wild type</i> (nativa)
GlnZ-his	Proteína GlnZ com cauda de histidina
GlnZ-wt	Proteína GlnZ <i>wild type</i> (nativa)
GMP	Guanina monofosfato
GOGAT	Glutamato sintetase
GS	Glutamina sintetase
IC <sub>50</sub>	Concentração inibidora de 50% da atividade
IPTG	Isopropil β-D-1- tiogalactopiranosideo
Kb	Kilobases
Km <sup>r</sup>	Resistência a canamicina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
MW	<i>Molecular Weight</i>
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotideo de nicotinamida oxidado

NADH	Dinucleotideo de nicotinamida reduzido
NAG	N-acetil glutamato
NAGK	N-Acetil glutamatoquinase
NAGK-his	N- Acetil glutamatoquinase com cauda de histidina
NAGK-wt	N- Acetil glutamatoquinase <i>wild type</i> (nativa)
NAGS	N-acetil glutamato sintase
NH <sup>4+</sup>	Íon amônio
NH <sup>3</sup>	Amônia
NifH	Dinitrogenase redutase
Ntr	Sistema de regulação de nitrogênio
NtrB	Histidina quinase
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato inorgânico
pI	Ponto Isoelétrico
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
UMP	Uridil monofosfato
UR	Uridil removente
UV	Ultravioleta
V/V	Volume por volume

## Sumário

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
2.	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
2.1.	<i>Azospirillum e Azospirillum brasilense</i>	15
2.2.	<i>Fixação biológica de nitrogênio</i>	16
2.3.	<i>Sistema ntr</i>	17
2.4.	<i>Proteínas PII</i>	18
2.5.	<i>GlnB e GlnZ de Azospirillum brasilense</i>	21
2.6.	<i>Mecanismos de Sensoriamento das Proteínas PII: ATP, ADP e 2-OG</i>	23
2.7.	<i>Participação da PII além do metabolismo de nitrogênio e triagem de alvos PII - NAGK</i>	24
2.8.	<i>N-acetil-L-glutamato quinase (NAGK) e a síntese de arginina</i>	25
2.9.	<i>A retroinibição da NAGK por arginina</i>	28
2.10.	<i>NAGK e a interação com as proteínas PII</i>	30
3.	<b>JUSTIFICATIVA</b>	35
4.	<b>OBJETIVOS</b>	36
4.1	<i>Objetivo Geral</i>	36
4.2	<i>Objetivos específicos</i>	36
5.	<b>METODOLOGIA</b>	37
5.1	<i>Bactérias e plasmídeos</i>	37
5.2.	<i>Meios de cultura</i>	37
5.3.	<i>Antibióticos</i>	37
5.4.	<i>Purificação de DNA plasmidial por lise alcalina (Minipreparação)</i>	38
5.5	<i>Separação de fragmentos de DNA via eletroforese em gel de agarose</i>	38
5.6	<i>Subclonagem do plasmídeo da NAGK nativa</i>	38
5.7	<i>Transformação bacteriana por choque térmico</i>	39
5.8	<i>Triagem dos clones recombinantes</i>	39
5.9	<i>Expressão e Purificação das proteínas de interesse</i>	40
5.10	<i>Separação de proteínas por eletroforese SDS - PAGE</i>	41
5.11	<i>Diálise</i>	41
5.12	<i>Quantificação de proteínas</i>	41
5.13	<i>Remoção da cauda de histidina 6x com protease TEV</i>	42
5.14	<i>Ensaio de co-precipitação in vitro (pull down)</i>	42
5.15	<i>Fotometria de Massas</i>	42
5.16	<i>Ensaio Cinéticos da atividade da NAGK</i>	43
5.17	<i>Cromatografia por exclusão de tamanho (Size Exclusion Chromatography – SEC)</i>	43
6.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	44
6.1	<i>Expressão e purificação de proteínas PII</i>	44
6.2	<i>Expressão, purificação e análise da enzima NAGK-His de Azospirillum brasilense</i>	45
6.3	<i>Capacitação internacional e preparação da proteína NAGK para estudos estruturais</i>	48
6.4	<i>Capacitação - Fotometria de massas NAGK-his</i>	51
6.5	<i>Capacitação - Cinética enzimática NAGK-his</i>	53
6.6	<i>Subclonagem de argB em pET29a para retirada da cauda de histidina da AbNAGK</i>	55

<b>6.7</b>	<b>Expressão e purificação da AbNAGK nativa.....</b>	<b>57</b>
<b>6.8.</b>	<b>Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).....</b>	<b>61</b>
<b>6.9</b>	<b>Ensaio de interação proteína – proteína NAGK-PII (pulldown assay).....</b>	<b>65</b>
<b>6.10</b>	<b>Predição do complexo NAGK-GlnZ.....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Azospirillum spp.* são um gênero de bactérias gram negativas, micro aeróbicas e pertencentes à subclasse  $\alpha$  (alfa) das proteobactérias (Döbereiner e Day 1976; Young, 1992). De natureza diazotrófica, são bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que vivem no solo colonizando raízes de plantas de interesse econômico, como as gramíneas (Döbereiner e Day, 1976; Döbereiner e Pedrosa, 1987).

O processo de fixação de nitrogênio possui elevado custo energético para a célula, com gasto de cerca de 16 moléculas de ATP (5' trifosfato de adenosina) por molécula de  $N_2$  fixado (Kim e Rees, 1982), necessitando de fina regulação celular que é promovida, em parte, pelas proteínas PII.

As proteínas da família PII são altamente conservadas em sua estrutura e função, relacionada com a regulação do metabolismo do nitrogênio e carbono. Sinalizam os níveis energéticos e níveis de nitrogênio e carbono celulares de acordo com a concentração de ATP, ADP, 2-oxoglutarato (2-OG) e glutamina. Sua interação com moléculas alvo dependem da variação da concentração desses metabólitos nas células (Arcondéguy *et al.*, 2001; Huergo *et al.*, 2012; Huergo *et al.*, 2013).

Proteínas PII possuem estrutura trimérica (Forchhammer 2008; Leigh e Dodsworth 2007), formando homotrímeros de forma cilíndrica, com três *loops* expostos, apresentando massa molecular de 12-13 kDa por monômero (Forchhammer, 2008; Truan *et al.*, 2010; Huergo *et al.*, 2012). Em  $\alpha$ -proteobactérias, comumente são encontrados dois genes de PII, *glnB*, codificando a proteína GlnB, e *glnK* codificando para a proteína GlnK. (Arcondéguy *et al.*, 2001; De Zamaroczy *et al.*, 1996; De Zamaroczy; Delorme; Elmerich, 1990; De Zamaroczy; Paquelin; Elmerich, 1993; Huergo *et al.*, 2012).

Em plantas e cianobactérias, as proteínas PII regulam a atividade da enzima N-acetil-L-glutamatoquinase (NAGK), que adiciona um grupo fosfato em N-acetil-L-glutamato (NAG), convertendo para N-acetil-glutamil fosfato (NAGP). A enzima controla a via da ornitina, que por sua vez, é importante para a síntese da arginina, precursor de poliaminas e do ciclo da ureia (Caldovic e Tuchman 2003; Maheswaran *et al.*, 2004; Maheswaran *et al.*, 2006; Llacer *et al.*, 2008; Forchhammer e Lüddecke, 2016; Gerhardt *et al.*, 2020). Duas classes da enzima NAGK foram identificadas; dimérica e insensível à arginina (*E. coli*), e hexamérica, sensível à arginina (Forcada-Nadal *et al.*, 2018; McClory *et al.*, 2019).

A interação entre as proteínas PII e NAGK leva à formação de um complexo que estimula a atividade catalítica de NAGK (Heinrich *et al.*, 2004). Em cianobactérias e plantas, a NAGK hexamérica é inibida por altas concentrações de arginina (Cunin *et al.*, 1986), por um mecanismo de retroinibição. A formação do complexo PII-NAGK alivia esse efeito inibitório uma vez que a ligação entre as duas proteínas promove alterações estruturais na NAGK,

diminuindo sua afinidade pela arginina. Dessa forma, em cianobactérias, na presença do complexo PII–NAGK, a arginina deixa de exercer seu papel inibitório sobre a enzima (Maheswaran *et al.*, 2004; Beez *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2020; Rozbeh e Forchhammer, 2021).

Até recentemente, dados da literatura indicavam que a interação entre PII-NAGK era restrita a organismos fotossintéticos, entretanto, estudos mais recentes sugerem a interação da NAGK com as PII em organismo não fotossintético, como no caso do trabalho de Selim *et al.*, (2020) com a alga *Polytomella parva*, *A. brasilense* por Gerhardt *et al.*, (2020) e *Corynebacterium glutamicum* por Xu *et al.*, (2020) os quais observaram interação entre as proteínas PII-NAGK nesses organismos não fotossintetizantes, sugerindo que os alvos de PII são altamente conservados durante a história evolutiva (Forchhammer *et al.*, 2022).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Azospirillum* e *Azospirillum brasilense*

O gênero *Azospirillum* spp. é composto por bactérias gram-negativas, microaeróbicas e pertencentes à subclasse  $\alpha$  (alfa) das proteobactérias, conforme análises de sequências de rRNA 16S (Döbereiner & Day, 1976; Young, 1992). Esse gênero inclui aproximadamente 20 espécies, entre as quais se destacam *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraenferens*, *A. doebereineriae* e *A. largimobile* (Baldani & Baldani, 2005; Tarrant, 1978; Magalhães *et al.*, 1983; Khammas *et al.*, 1989; Reinhold *et al.*, 1987; Sly, 1999). Dentre elas, *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as espécies mais amplamente estudadas atualmente (Baldani & Baldani, 2005). De natureza diazotrófica, essas bactérias fixam nitrogênio atmosférico e habitam o solo, colonizando as raízes de gramíneas de interesse econômico (Döbereiner *et al.*, 1976; Döbereiner & Pedrosa, 1987).

As bactérias do gênero *Azospirillum* apresentam grande potencial como biofertilizantes devido à sua capacidade de colonizar raízes de diversas espécies de plantas, ampla distribuição geográfica e eficiência na fixação biológica de nitrogênio *in vitro* (Pedrosa, 1987). Elas já foram isoladas de raízes de mais de 100 espécies vegetais, podendo também ser aplicadas em plantas sem histórico prévio de colonização por *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2004).

Devido à especificidade associativa com gramíneas de interesse econômico, cereais como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) se beneficiam do potencial de promoção do crescimento vegetal dessas bactérias. Esse efeito ocorre por diferentes mecanismos, incluindo a produção e modulação de fitohormônios como auxinas, citocininas, etileno e giberelinas na rizosfera, além da fixação biológica de nitrogênio (Tien *et al.*, 1979; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Em experimentos de inoculação em campo, organismos do gênero *Azospirillum* foram capazes de aumentar o rendimento de várias gramíneas economicamente importantes em diferentes solos e regiões climáticas (Patriquin *et al.*, 1983; Okon & Vanderleyden, 1997).

O uso de inoculantes contendo *Azospirillum* tem o potencial de reduzir a aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados, diminuindo custos e impactos ambientais associados a esses insumos (Hungria *et al.*, 2010). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) já aprovou o uso desses biofertilizantes para as culturas de milho e trigo. A inoculação com *Azospirillum brasilense* permite uma redução de até 50% no uso de fertilizantes nitrogenados, mantendo a produtividade das culturas. No contexto brasileiro, isso representa uma economia de aproximadamente 52 kg de N ha<sup>-1</sup> em 14,1 milhões de hectares para o milho e cerca de 35 kg de N ha<sup>-1</sup> em 2,4 milhões de hectares para o trigo, gerando

uma economia estimada em US\$ 1,2 bilhão por ano (Hungria *et al.*, 2010). A utilização de inoculantes contendo *Azospirillum*, permite a redução significativa ou mesmo a substituição do uso de fertilizantes químicos nitrogenados, contribui de forma expressiva para a sustentabilidade ambiental e a eficiência econômica da agricultura.

## 2.2. Fixação biológica de nitrogênio

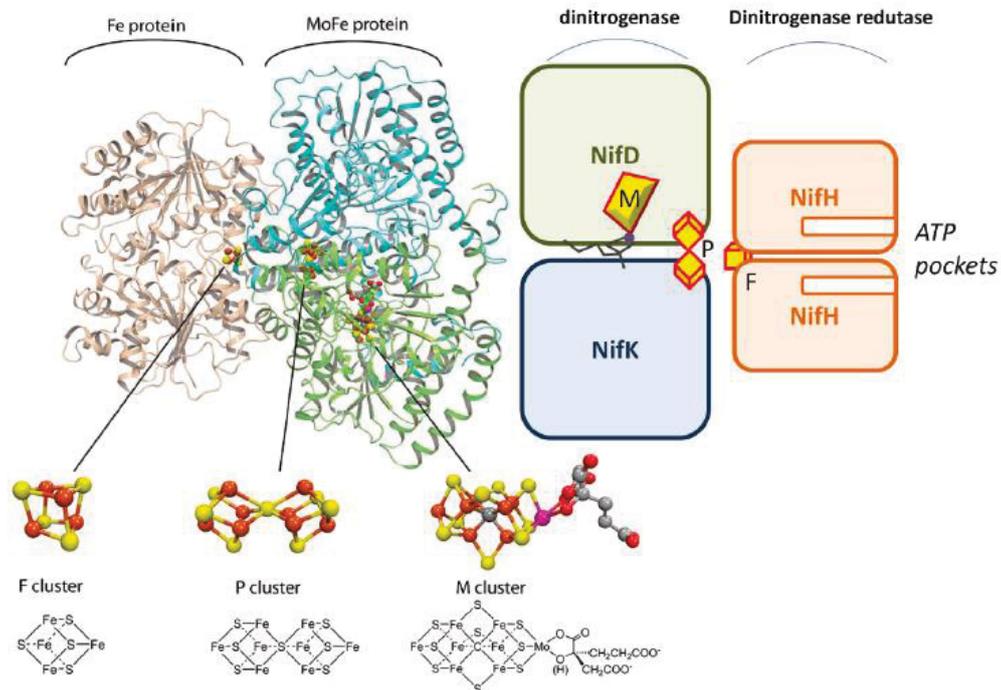
A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o gás dinitrogênio N<sub>2</sub> atmosférico é reduzido a amônio (NH<sub>4</sub>) dentro da bactéria, e a reação é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase.

A reação de fixação biológica do nitrogênio envolve duas enzimas distintas, codificadas por três genes, amplamente estudadas em *Azotobacter vinelandii*, organismo modelo para o sistema nitrogenase. A proteína dinitrogenase redutase (NifH) é um homodímero de 40 kDa com dois sítios de ligação ao ATP (um por monômero) e um cluster [4Fe-4S] localizado na interface entre as subunidades (Georgiadis *et al.*, 1992). Sua função é transferir elétrons à proteína ferro-molibdênio (NifDK ou dinitrogenase), responsável pela catálise da reação. A NifDK é um tetrâmero de 250 kDa formado por dois heterodímeros NifDK, cada um contendo dois centros metálicos: o cluster P (8Fe-7S), que recebe os elétrons de NifH (Chan *et al.*, 1993), e o cluster M (7Fe-9S-C-Mo-homocitrato), onde ocorre a redução do N<sub>2</sub> conforme demonstrado na figura 1 (Lancaster *et al.*, 2011). As duas metades do tetrâmero operam de forma alternada, devido à cooperatividade negativa, onde um dímero é inibido enquanto o outro está ativo (Danyal *et al.*, 2016).

Esse processo impõe um elevado custo energético à célula, pois a conversão exige um gasto expressivo de energia, consumindo 16 moléculas de ATP para cada molécula de N<sub>2</sub> fixada (Kim & Rees, 1982). A reação estequiométrica desse processo foi descrita por Eady (1986) e Postgate (1987) da seguinte forma:



Devido a esse alto custo metabólico, as vias relacionadas à fixação e ao metabolismo do nitrogênio são finamente reguladas, tanto em nível de atividade enzimática quanto na expressão gênica (Postgate, 1982).



**Figura 1 - Representação das proteínas Fe (NifH) e FeMo (NifDK) da nitrogenase.** A estrutura mostra metade do heterooctâmero Fe–FeMo, com NifH em laranja na periferia do complexo. Cada dímero de NifH possui um cluster F ([4Fe-4S]) que interage com FeMo, além de sítios de ligação de ATP na face oposta. A FeMo é um tetrâmero de dois heterodímeros NifDK (NifD em verde, NifK em azul), cada um contendo um cluster P ([8Fe-7S]) e um cluster M ([7Fe-9S-C-Mo-homocitrato]), onde ocorre a catálise. A transferência de elétrons ocorre do cluster F (NifH) → P (NifDK) → M (sítio catalítico). A interação entre as metades do tetrâmero é anticoperativa. Fonte: Hoffman *et al.*, 2014.

### 2.3. Sistema *ntr*

O sistema *ntr* (*nitrogen regulation*) constitui um dos principais mecanismos regulatórios do metabolismo de compostos nitrogenados em bactérias, coordenando a expressão de genes envolvidos na assimilação, biossíntese e reciclagem de compostos nitrogenados em resposta à disponibilidade de nitrogênio no ambiente (Merrick & Edwards, 1995; Sacomboio *et al.*, 2017). Essa rede é composta por genes que codificam proteínas reguladoras, principalmente, nos níveis transcricional e pós-transcricional.

Entre seus componentes centrais, o gene *ntrA* codifica o fator sigma 54 ( $\sigma^{54}$ ), subunidade da RNA polimerase essencial para a transcrição de genes associados à assimilação e fixação de nitrogênio, incluindo *glnA*, que codifica a glutamina sintetase (GS), enzima chave na assimilação de amônia, e *glnZ*, que em *Azospirillum brasilense* codifica a proteína PII GlnZ (McFarland *et al.*, 1981; Reitzer, 2003; De Zamaroczy *et al.*, 1998). A ativação de  $\sigma^{54}$  é dependente do regulador transcricional NtrC, codificado por *ntrC*, que, em sua forma fosforilada, interage com a RNA polimerase  $\sigma^{54}$  para promover a transcrição de genes sob seu

controle. A fosforilação de NtrC é catalisada pela histidina quinase NtrB, que sensoria alterações no estado nitrogenado intracelular e ajusta a resposta regulatória (McFarland *et al.*, 1981; Hankenbeck & Stock, 1996).

A modulação da atividade de NtrB e NtrC é realizada pelas proteínas PII (GlnB e GlnK) e pela uridililtransferase, GlnD. Em condições de alta disponibilidade de nitrogênio, o aumento de glutamina intracelular estimula GlnD a remover UMP de GlnB, permitindo que esta interaja com NtrB e promova a desfosforilação de NtrC, inativando-o (Arcondéguy *et al.*, 2001; Jiang & Ninfa, 1999). Sob limitação de nitrogênio, GlnD uridilila GlnB, impedindo sua ligação a NtrB, dessa forma, NtrB fosforila NtrC, ativando a expressão de genes voltados à utilização de fontes alternativas de nitrogênio (Atkinson *et al.*, 1994; Jiang & Ninfa, 2000). Em *E. coli*, o sistema envolve pelo menos sete proteínas; NtrB, NtrC, GlnD, GlnB, GlnK, GlnE e GlnA, sendo a proteína PII elemento central na integração dos sinais metabólicos (Merrick & Edwards, 1995; Ninfa & Atkinson, 2000; Arcondéguy *et al.*, 2001).

Em proteobactérias diazotróficas, a mesma maquinaria regulatória controla indiretamente a expressão dos genes *nif*, responsáveis pela síntese da nitrogenase. Esses genes são transcritos a partir de promotores dependentes de  $\sigma^{54}$  e requerem o regulador NifA, cuja atividade é modulada pela disponibilidade de oxigênio e nitrogênio fixado (Dixon, 1998; Merrick, 1992; Dixon & Kahn, 2004). NifA apresenta três domínios funcionais distintos, incluindo o domínio GAF, localizado na região N-terminal, que participa de interações proteína-proteína e é assim denominado pelas iniciais de *GMP-specific phosphodiesterases* (PDEs), *adenylyl cyclases* e FhIA (Drummond *et al.*, 1986; Drummond *et al.*, 1990).

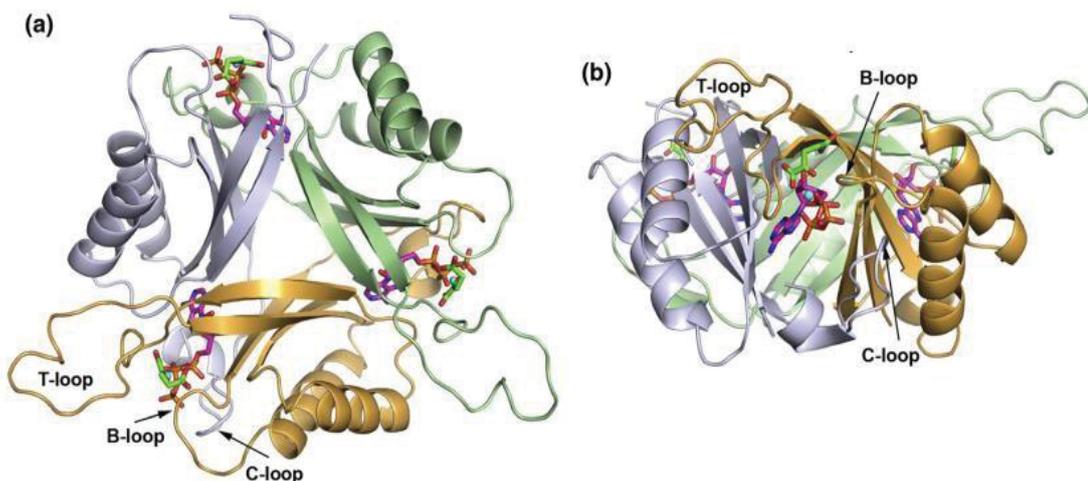
Em  $\alpha$ -proteobactérias e algumas  $\beta$ -proteobactérias diazotróficas, as proteínas PII regulam diretamente a atividade de NifA (Dixon & Kahn, 2004). Em *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Rhodospirillum rubrum*, as PII são necessárias para ativar NifA sob limitação de nitrogênio, enquanto em *Rhodobacter capsulatus* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* parecem atuar reprimindo sua atividade em condições de excesso desse elemento. Em *A. brasilense*, especificamente, o domínio GAF de NifA exerce função autoinibitória que é revertida quando GlnB uridililada interage com NifA durante a limitação de nitrogênio, promovendo a ativação da transcrição dos genes *nif* (Arsene *et al.*, 1999; Van Dommelen *et al.*, 2002; Huergo *et al.*, 2005). Esse mecanismo garante que a fixação biológica de nitrogênio seja ajustada dinamicamente à disponibilidade ambiental de amônio (Chen *et al.*, 2005; Huergo *et al.*, 2005).

#### 2.4. Proteínas PII

As proteínas PII são proteínas multitarefas, transdutoras de sinais, com estrutura e função altamente conservadas ao longo da evolução no domínio procariótico e eucariótico, como bactérias, arqueias e plastídios de plantas, respectivamente. Consideradas uma das maiores

famílias de proteínas sinalizadoras da natureza, sensoriam o estado energético, de carbono e nitrogênio das células e levam a informação para outras proteínas alvo de interação com PII e essenciais ao metabolismo (Forchhammer *et al.*, 2022; Forchhammer & Ludekke, 2015; Huergo *et al.*, 2012).

Proteínas PII são homotrimeros de forma cilíndrica, com massa molecular de 12-13 kDa por monômero (Figura 2) (Forchhammer, 2008; Leigh & Dodsworth 2007; Truan *et al.*, 2010; Huergo *et al.*, 2012). Cada monomero contém em sua estrutura 3 três regiões de *loops*, *loop* T, B e C. O *loop* T fica exposto ao solvente e é o ponto chave para a maioria das interações entre as proteínas PII e seus alvos, pois facilita a interação devido a sua flexibilidade (Arcondeguy *et al.*, 2001). Em *E. coli*, a ligação de ATP e ADP pode ocorrer de forma competitiva (Jiang *et al.*, 2007), e a ligação de 2-oxoglutarato (2-OG) e ATP de forma cooperativa (Kamberov *et al.*, 1995, Jiang *et al.*, 2007, Forchhammer 2008), e requer o envolvimento do cátion divalente  $Mg^{2+}$  (Xu *et al.*, 1998). Além disso, ADP age antagonisticamente ao 2-OG (Jiang e Ninfa, 2007). O *loop* T e B de um monômero e o *loop* C do monômero adjacente formam uma fenda lateral que constitui um sítio de ligação (Huergo *et al.*, 2012), onde efetores como ADP, ATP e 2-OG podem se ligar e modificam a conformação do *loop* T, resultando na interação ou não interação com a proteína alvo (Figura 2) (Forchhammer *et al.*, 2022; Truan *et al.*, 2010).



**Figura 2 - Representação do trímero de GlnZ de *A. brasilense*.** O trímero está ligado à ATP (magenta), 2-OG (verde) e  $Mg^{2+}$  (azul). Os *loops* T, B e C são indicados por setas. A) Vista superior. B) Vista lateral. Fonte: Truan *et al.*, 2010.

Arcondeguy e colaboradores (2001) classificam as proteínas PII em três grupos principais, de acordo com os genes que as codificam: *glnB*, *glnK* e *nifl*. Posteriormente, Sant'Anna e colaboradores (2009) acrescentaram um quarto grupo, denominado PII New Group (PII-NG), composto por proteínas que, apesar de não possuírem alguns dos sítios característicos das PII clássicas, apresentam homologia de sequência com elas. Em geral,

proteobactérias e arqueias codificam múltiplas proteínas PII, predominantemente GlnB e GlnK, enquanto cianobactérias e plantas possuem apenas uma variante, GlnB para cianobactérias e GlnB-like para plantas, encontradas no cloroplasto de espécies como *Arabidopsis thaliana* (GLNB1) (Merrick, 2015). Em plantas, são chamadas de GlnB-like devido a suas sequências apresentarem homologia à GlnB de bactérias, porém com a adição de um domínio N- terminal de aproximadamente 70 aminoácidos e segundo Chellamuthu *et al.*, (2014), a principal função das GlnB-like em plantas é atuar como sensores e reguladores do metabolismo de nitrogênio, integrando sinais de nitrogênio, carbono e energia celular para controlar processos metabólicos essenciais. (Arcondéguy *et al.*, 2001. Chellamuthu *et al.*, 2014).

As proteínas da família PII estão amplamente distribuídas entre as proteobactérias, sendo GlnB e GlnK, codificadas pelos genes *glnB* e *glnK* respectivamente, as mais estudadas no organismo modelo *E. coli* (Son e Rhee, 1987; Van Heeswijk *et al.*, 1996; Arcondéguy *et al.*, 2001). A proteína GlnB em *E. coli*, atua como sensor do estado nitrogenado da célula ao integrar sinais de 2-oxoglutarato (2-OG), por ligação alostérica, e de glutamina, cujo efeito é mediado indiretamente por meio da modulação da atividade da enzima GlnD (Leigh e Dodsworth, 2007). Em condições de alta concentração de glutamina, GlnD exibe atividade removedora de uridilil (UR), promovendo a desuridililação da proteína PII. A forma desuridililada de GlnB interage com a enzima adenililtransferase (ATase), indicando um estado de suficiência nitrogenada e resultando na inativação progressiva da enzima glutamina sintetase (GS) via adenilação de suas 12 subunidades. Em contraste, sob baixa disponibilidade de nitrogênio, a GS é reativada por desadenilação catalisada pela mesma ATase, agora em complexo com GlnB-UMP. Além disso, GlnB não uridililada regula a atividade da quinase NtrB, responsável pela modulação do estado de fosforilação da proteína NtrC, regulador transcricional conforme mencionado no tópico anterior (Ninfa e Jiang, 2005; Leigh e Dodsworth, 2007).

Já a proteína GlnK, paróloga de GlnB, é coexpressa com o gene *amtB* em um *operon*, que codifica uma proteína transmembrana responsável pelo transporte de amônio. Em *E. coli*, GlnK e GlnB compartilham 67% de identidade em sua sequência (Van Heeswijk *et al.*, 1996). Ambas apresentam funções sobrepostas, como a regulação da ATase e de NtrB, embora GlnB demonstre maior eficácia nessas funções (Atkinson e Ninfa, 1999). Assim como GlnB, GlnK também sofre uridililação em resposta ao estado nitrogenado, especificamente no resíduo 51 (Atkinson e Ninfa, 1998). Uma das funções mais discutidas de GlnK é sua interação com AmtB, bloqueando o canal de transporte de amônia. Essa interação ocorre por meio da região do loop T da proteína e depende do estado de uridililação: apenas a forma livre e desuridililada de GlnK é capaz de se associar a AmtB (Radchenko *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2011).

Em *A. brasilense*, a proteína GlnK não está presente, mas sim GlnZ, uma PII funcionalmente semelhante à GlnK de *E. coli*, ambas são consideradas ortólogas, por derivarem de um gene ancestral comum presente antes da diversificação das espécies (Sant'Anna *et al.*, 2009). Por outro lado, GlnB e GlnZ em *A. brasilense* são parálogas, pois resultaram de uma duplicação gênica ancestral, anterior a espécie (De Zamaroczy *et al.*, 1998). Diferentemente da GlnK de *E. coli*, que está geneticamente associada ao gene *amtB*, GlnZ não está vinculada ao *amtB* em *A. brasilense*, o que pode refletir diferenças na regulação gênica, apesar da conservação funcional (Moure *et al.*, 2011).

Em cianobactérias, a PII presente é unicamente a GlnB, proveniente de um gene monocistrônico dependente de  $\sigma^{70}$ , cuja transcrição é aumentada na ausência de nitrogênio (Arcondéguy *et al.*, 2001). Diferente das PII de *E. coli*, que são modificadas por uridililação em Tyr51 sob o controle da enzima bifuncional GlnD em resposta direta aos níveis de glutamina, as PII de cianobactérias sofrem fosforilação em um resíduo de serina (Ser49), localizado próximo a esse mesmo Tyr51 (Forchhammer & Hedler, 1997). Enquanto em *E. coli* a uridililação atua como sensor primário do estado de nitrogênio, em cianobactérias a fosforilação depende de 2-oxoglutarato e ATP, funcionando como um integrador do balanço entre carbono e nitrogênio (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995).

## 2.5. GlnB e GlnZ de *Azospirillum brasilense*

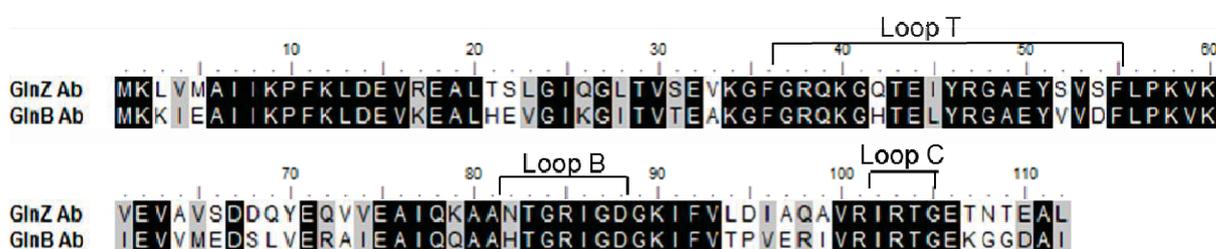
Em *A. brasilense*, GlnB e GlnZ estão envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio, apresentam 112 resíduos de aminoácidos e 81% de similaridade (figura 3) entre ambas, porém exercem funções metabólicas distintas na célula (De Zamaroczy *et al.*, 1996).

A proteína GlnB é expressa de forma constitutiva, através do promotor  $\sigma^{70}$ , porém sua expressão é aumentada em limitação de nitrogênio, via promotor  $\sigma^{54}$ , ativado por NtrC, tornando o sistema *ntr* essencial para sua regulação, mesmo em condições de excesso de nitrogênio. Já a expressão de GlnZ ocorre exclusivamente sob controle de  $\sigma^{54}$ , sendo regulada de maneira semelhante à GlnB em resposta à disponibilidade de nitrogênio.

GlnB, produto do gene *glnB*, é essencial para a regulação da fixação de nitrogênio e é estruturalmente caracterizada pela presença de um resíduo de lisina na posição 3, glutamato ou aspartato na posição 5. Uma de suas funções conhecidas em *A. brasilense* é o controle da atividade do ativador transcricional NtrC a partir da interação de GlnB com NtrB, que é requerido para a atividade da NifA, ativador transcricional dos genes *nif*, relacionados à captação e metabolismo do nitrogênio (Arcondéguy *et al.*, 2001; Araújo *et al.* 2008, De Zamaroczy *et al.*, 1996; De Zamaroczy *et al.*, 1998). GlnB é encontrada predominantemente em proteobactérias e cianobactérias, e como mencionado anteriormente, está organizada em

*operon* em conjunto à *glnA* (figura 4) como em *A. brasilense* ou à *nadE* em outros organismos (Arcondeguy *et al.*, 2001). O gene *glnA*, que codifica para a GS é requerido para a assimilação de amônia, enquanto o *nadE* codifica para NAD sintetase, enzima envolvida na última etapa de síntese de NAD<sup>+</sup> (Arcondeguy *et al.*, 2001; De Zamaroczy *et al.*, 1990; Inaba *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2018).

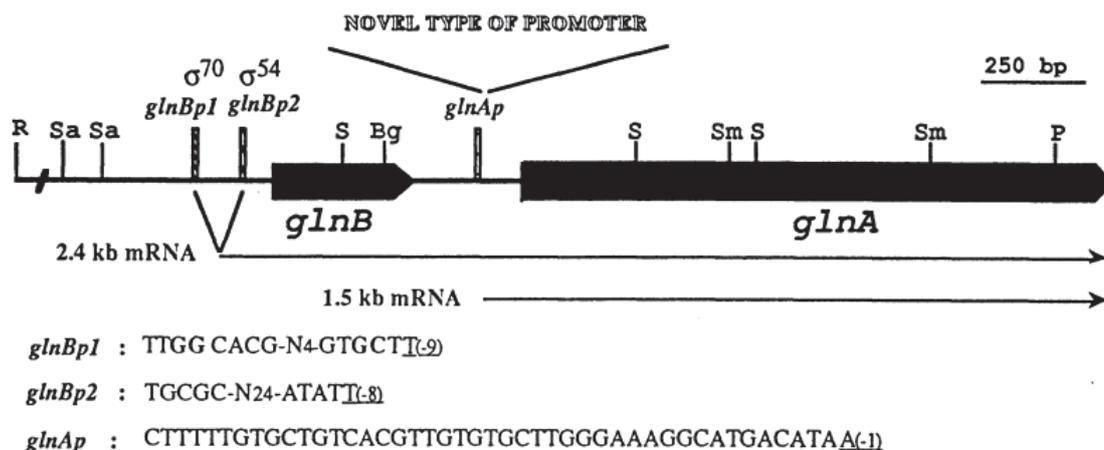
Interessantemente, em *A. brasilense* são encontradas 3 NAD sintetases, NadE1 e NadE2 que são glutamina dependentes e NadE3, amônio dependente. NadE1 e NadE2 foram identificadas como alvos de GlnZ (Gerhardt *et al.*, 2020), sendo que GlnZ regula a biossíntese de NAD<sup>+</sup> em bactérias ao aliviar a retroinibição das enzimas NadE2<sup>Gln</sup>, atuando como um interruptor molecular conservado que coordena a produção de NAD<sup>+</sup> com a disponibilidade de nutrientes (Santos *et al.*, 2020).



**Figura 3 – Alinhamento (clustal W) das proteínas GlnZ e GlnB de *A. brasilense*.** Resíduos conservados são mostrados em preto; resíduos similares são mostrados em cinza; resíduos diferentes são mostrados em branco. As regiões dos *loops* estão indicadas. Fonte: Gerhardt, 2012.

GlnZ de *A. brasilense*, ortóloga à GlnK de *E. coli*, é codificada pelo gene monocistrônico *glnZ*, cuja transcrição é dirigida por um promotor dependente do fator  $\sigma^{54}$ , ativado pela proteína reguladora NtrC. Sua expressão está sob controle do sistema *Ntr* e ocorre em limitação de nitrogênio, sendo particularmente intensificada na presença de aspartato, sugerindo que o aspartato atua como um sinal metabólico que ativa o sistema *Ntr*, promovendo a transcrição de GlnZ mesmo quando há excesso de nitrogênio (De Zamaroczy *et al.*, 1998).

A GlnZ interage com o transportador de amônio AmtB, exercendo um papel central na regulação desse transportador, pois forma complexos funcionais com AmtB para formar um complexo de membrana em resposta ao choque de amônio e sequestrar DraG, enzima reguladora da nitrogenase (Huergo *et al.*, 2006; Huergo *et al.*, 2007, Moure *et al.*, 2019). Estudos demonstraram que, em condições de alto nitrogênio, GlnZ se liga ao AmtB, promovendo sua inativação e, conseqüentemente, impedindo a entrada excessiva de amônio na célula (Arcondeguy *et al.*, 2001; Moure *et al.*, 2019; Gerhardt *et al.*, 2020).



**Figura 4 – Organização do conjunto de genes *glnB* e *glnA* de *A. brasilense*.** Fonte: Zamaroczy et al., 1990.

Além de seu papel na regulação do transportador de amônio AmtB, Gerhardt *et al.*, (2020) observaram indícios que GlnZ também está envolvida na homeostase do nucleotídeo cíclico di-GMP (c-di-GMP), um segundo mensageiro crucial na regulação de processos celulares em bactérias. A deleção do gene *glnZ* resultou em um aumento significativo na floculação e redução na aerotaxia, fenótipos diretamente associados a níveis elevados desse segundo mensageiro. Essas descobertas sugerem que GlnZ desempenha um papel essencial na regulação do c-di-GMP, influenciando a transição entre estados fisiológicos, como motilidade e adesão celular, fundamentais para a adaptação de *A. brasilense* ao seu ambiente (Forchhammer *et al.*, 2022; Gerhardt *et al.*, 2020).

## 2.6. Mecanismos de Sensoriamento das Proteínas PII: ATP, ADP e 2-OG.

As proteínas PII monitoram o estado metabólico celular por meio da ligação a ATP, ADP, 2-oxoglutarato (2-OG) e glutamina (Forchhammer, 2008; Ninfa & Jiang, 2005; Jiang & Ninfa, 2007). O 2-OG, intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e precursor na síntese de aminoácidos, atua como esqueleto carbônico na assimilação de nitrogênio e como sinalizador do balanço carbono/nitrogênio.

Em muitos procaríotos, sua concentração é modulada pela via GS/GOGAT (*glutamina sintetase / glutamato sintetase*), na qual a GS assimila amônia convertendo glutamato em glutamina, e a GOGAT transfere o grupo amino da glutamina para o 2-OG, gerando glutamato e reduzindo os níveis intracelulares de 2-OG (Leigh & Dodsworth, 2007). Assim, níveis elevados de 2-OG indicam limitação de nitrogênio, enquanto níveis baixos indicam suficiência desse nutriente. Em *A. brasilense*, a glutamato desidrogenase (GDH) também pode participar da síntese de glutamato, embora com menor afinidade e importância fisiológica que a GS (Westby *et al.*, 1987). Paralelamente, ATP e ADP ligados às PII refletem o estado energético

da célula (Forchhammer *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2013).

Dessa forma, PII atua como sensor energético pela relação ATP/ADP e como integrador dos sinais de carbono e nitrogênio (Gerhardt *et al.*, 2020). Em alguns organismos como em *Chlamydomonas reinhardtii* e *Physcomitrella patens*, PII não se liga ao ADP, sugerindo uma especialização evolutiva para o ATP, enquanto em *P. patens* e *P. parva*, a PII não responde a 2-OG (Lapina *et al.*, 2018; Selim *et al.*, 2020), apontando divergências evolutivas para a proteína.

Já em *E. coli*, a concentração de 2-OG e a razão ATP/ADP influenciam a formação do complexo GlnK-AmtB (Durand & Merrick, 2006; Teixeira *et al.*, 2008; Wolfe *et al.*, 2007; Conroy *et al.*, 2007) e regulam interações de PII com outras proteínas, como NtrB e ATase também em *E. coli* (Jiang & Ninfa, 2009), GlnB com NAGK e PipX em *Synechococcus elongatus* (Fokina *et al.*, 2011), AmtB e GlnZ em *A. brasilense* (Gerhardt *et al.*, 2012; Moure *et al.*, 2019). Em *A. brasilense*, a ligação de ATP ou ADP a PII depende da concentração de 2-OG: altas concentrações favorecem ATP, enquanto baixas favorecem ADP, destacando o papel de 2-OG como sinalizador (Gerhardt *et al.*, 2012).

## **2.7. Participação da PII além do metabolismo de nitrogênio e triagem de alvos PII - NAGK**

Devido ao amplo papel do 2-oxoglutarato (2-OG) no metabolismo, surgiu a hipótese de que as proteínas PII também poderiam coordenar também o metabolismo de carbono (Ninfa e Jiang, 2005; Commichau *et al.*, 2006). Essa hipótese foi reforçada em 2010, quando Feria-Bourrelier *et al.*, (2010) observaram que a subunidade BCCP (*Biotin Carboxyl Carrier Protein*) da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), responsável por catalisar a primeira etapa da biossíntese de ácidos graxos, é um alvo da proteína PII em *Arabidopsis thaliana*. Esse achado representou a primeira evidência de uma enzima regulada por PII fora do metabolismo do nitrogênio.

Nos anos seguintes, estudos proteômicos revelaram que a subunidade BCCP de ACC também interage com PII em *A. brasilense* e que a proteína GlnK de *E. coli* forma um complexo estável com BCCP (Rodrigues *et al.*, 2014; Gerhardt *et al.*, 2015) e que as proteínas GlnB de *A. brasilense* e *E. coli* podem formar um complexo ternário com as subunidades BC-BCCP de ACC, regulando a atividade de ACC (Gerhardt *et al.*, 2015). A conservação dessa interação em organismos evolutivamente distantes sugere que BCCP é um ligante ancestral de PII (Rodrigues *et al.*, 2014). Além disso, a funcionalidade do complexo também parece ser conservada, pois tanto em *A. thaliana* quanto em *E. coli*, o complexo inibe a atividade da ACC (Feria-Bourrelier *et al.*, 2010; Huergo e Dixon, 2015).

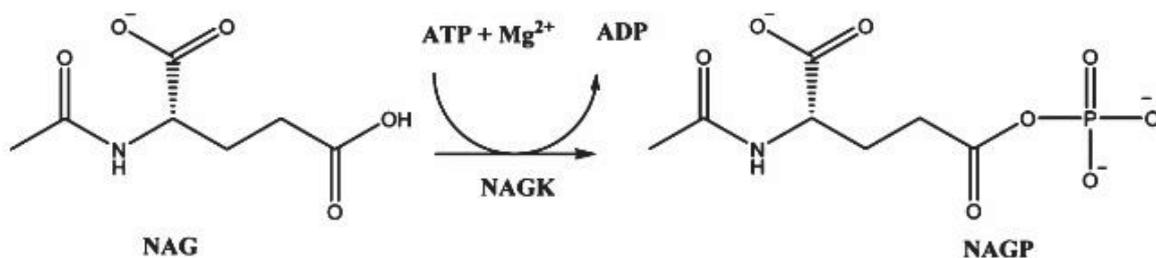
Após essas descobertas, Gerhardt *et al.* (2020) investigaram o papel da proteína PII GlnZ na regulação celular em *A. brasilense*, com foco em sua interação com diversas proteínas-

alvo. A partir de ensaios extensivos de *ligand-fishing* realizados em *A. brasilense*, os autores identificaram 37 proteínas potencialmente interagindo com PII, incluindo alvos já conhecidos, como BCCP, ATase e NAGK. Adicionalmente, experimentos de *pull-down* confirmaram novas interações de GlnZ com proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio, metabolismo de ácidos graxos, sinalização, biossíntese de cofatores, catabolismo de RNA e transcrição.

Entre os alvos identificados nesse trabalho, está a proteína N-acetil-L-glutamatoquinase (NAGK) como um dos alvos de interação de GlnZ, reforçando o papel dessa proteína na regulação do metabolismo de nitrogênio (Gerhardt *et al.*, 2020).

## 2.8. N-acetil-L-glutamato quinase (NAGK) e a síntese de arginina

A enzima N-acetil-L-glutamatoquinase (NAGK; E.C. 2.7.2.8) é a segunda enzima da biossíntese da arginina, codificada pelo gene *argB*, promove a fosforilação do grupamento COOH do N-acetilglutamato (NAG) formando N-acetilglutamil fosfato (NAGP) (figura 5) na segunda etapa da biossíntese de arginina (Cunin *et al.*, 1986).

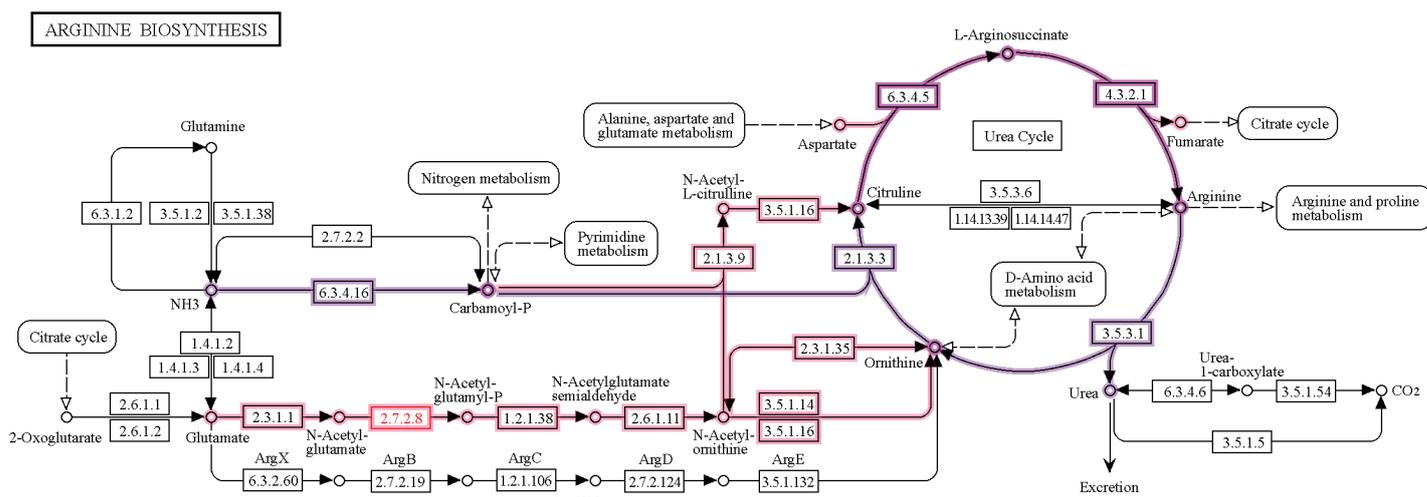


**Figura 5. Fosforilação do N – acetil – L – glutamato (NAG) em N – acetil – glutamil fosfato (NAGP) pela ação da enzima N-acetyl-L-glutamatoquinase (NAGK) na presença de ATP e Mg<sup>2+</sup>.** Fonte: McClory *et al.*, (2019).

A enzima NAGK é amplamente estudada em cianobactérias, especialmente por sua relevância no metabolismo do nitrogênio, pois catalisa o passo limitante na biossíntese de arginina, precursor direto da cianoficina, principal reserva nitrogenada desses organismos (Belay *et al.*, 2021; Burillo *et al.*, 2004; Forcada-Nadal *et al.*, 2018; Liácer *et al.*, 2008). Esse composto, constituído por cadeias de poli-L-aspartato com resíduos de L-arginina ligados, apresenta proporções quase equimolares de ácido aspártico e arginina, sendo esta última a principal fornecedora de nitrogênio para cianobactérias para a formação da cianoficina (Watzer *et al.*, 2015; Allen, 1988). Devido a essa demanda significativa da via biossintética da arginina no metabolismo nitrogenado das cianobactérias, NAGK desempenha um papel crucial, destacando-se por ser a única enzima dessa via (Figuras 6 e 7) regulada pelas proteínas PII. Além da regulação por PII, sua atividade é também modulada por mecanismo de *feedback*,

sendo inibida diretamente pela arginina, o que permite o ajuste fino da produção desse aminoácido conforme a demanda celular. Assim, NAGK atua como ponto-chave de modulação para a produção de arginina em diversos organismos, principalmente cianobactérias, catalisando uma etapa limitante do fluxo na via metabólica. (Fernández-Murga *et al.*, 2004; Gil-Ortiz *et al.*, 2010; Ramón-Maiques *et al.*, 2002; Yang, 2017).

A via metabólica ilustrada na figura 6 descreve a síntese da arginina a partir do glutamato, sendo amplamente conservada entre cianobactérias, *E. coli* e *A. brasilense*. No entanto, há exceção quanto à presença de duas enzimas. A enzima EC 3.5.1.16, acetilornitina desacetilase, está presente tanto em *E. coli* quanto em *A. brasilense*, mas ausente em cianobactérias (Kanehisa *et al.*, 2000). Já a enzima EC 3.5.1.14, desacetilase de acetilornitina não está presente em *A. brasilense*, mas está em bactérias como a *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias gram-negativas, onde a enzima catalisa a conversão de N-acetilornitina em ornitina envolvidas na biossíntese da arginina por meio da via da acetilornitina (Javid-Majd & Blanchard 2000).



**Figura 6.** Via Metabólica da síntese da arginina através da síntese de ornitina em *E. coli*. Destacado em vermelho escuro, que por sua vez entra no ciclo da ureia (destacado em roxo) e é precursora da arginina. A posição da enzima NAGK (2.7.2.8) na via está destacada em vermelho claro. Fonte: Maas & Lipmann (1953)

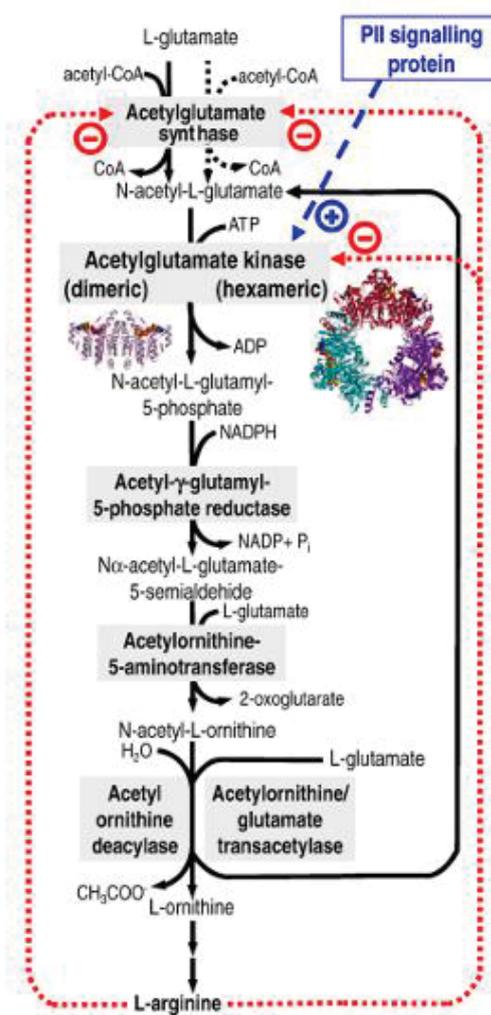
Essa variação enzimática reflete diretamente na forma como ocorre a remoção do grupo acetil da acetilornitina, quinta etapa da via biossintética. Esse processo pode seguir dois mecanismos distintos: de forma hidrolítica, como em *E. coli*, ou, mais frequentemente, por transacetilação do grupo acetil para o glutamato, como observado em *P. aeruginosa* e *Thermotoga maritima*. Nesse último caso, há reciclagem do N-acetilglutamato. A escolha entre esses mecanismos influencia o ponto de retroinibição exercido pela arginina. Em *E. coli*, onde a remoção do grupo acetil é hidrolítica, NAGK apresenta forma dimérica, e a retroinibição

ocorre sobre a NAG sintetase, primeira enzima da via. Já nas espécies que utilizam a transacetilação, a NAGK é hexamérica e sofre retroinibição direta pela arginina, como podemos observar na figura 7 (Ramón-Maiques *et al.*, 2006; Fernández-Murga *et al.*, 2008; Llácer *et al.*, 2008).

Como abordado anteriormente, a arginina em cianobactérias desempenha papel central tanto como aminoácido estrutural quanto como reserva de nitrogênio, sendo precursora de compostos como a cianoficina, polímero de armazenamento de nitrogênio de interesse biotecnológico (Bolay *et al.*, 2021; Llácer *et al.*, 2008; Watzer *et al.*, 2015). O estoque de arginina em cianobactérias foi evolutivamente selecionado devido a arginina ser considerada uma molécula ideal para o armazenamento de nitrogênio devido ao seu alto teor de nitrogênio em relação ao carbono, tornando-a eficiente para estocar grandes quantidades desse elemento sem causar impacto osmótico significativo nas células, especialmente quando incorporada em polímeros como a cianoficina (Winter *et al.*, 2015).

Já em *A. brasilense*, não há evidências na literatura sobre a produção da cianoficina. A arginina aqui tem papel menos central no metabolismo, ainda pouco explorado na espécie, o destino conhecido do aminoácido é principalmente a síntese de poliaminas, onde a arginina será convertida a putrescina, a principal poliamina, mas também a espermidina, espermina e cadaverina, compostos que irão contribuir para o metabolismo bacteriano e posteriormente para o crescimento vegetal (Perrig *et al.*, 2007). Dentre as principais funções das poliaminas, estão a síntese de DNA, RNA e proteínas (Perrig *et al.*, 2007).

Para outras alfa-proteobactérias, o metabolismo da arginina é altamente versátil, como no gênero *Pseudomonas spp*, e desempenha papéis centrais tanto na assimilação de carbono e nitrogênio quanto na adaptação a diferentes condições ambientais. Nessas bactérias, a arginina pode ser utilizada como fonte de energia, carbono e nitrogênio, sendo metabolizada principalmente por vias como a via da arginina succiniltransferase (AST), que é induzida quando a arginina está disponível e resulta na produção de intermediários como succinilornitina e, eventualmente, glutamato, integrando-se ao metabolismo central (Stalon *et al.*, 1987; Anderson & Chakravarty, 2015).



**Figura 7. Esquema da biossíntese de arginina em microrganismos e plantas.** A metade esquerda do diagrama representa a rota que opera em *E. coli*, enquanto que na direita representa a rota que opera na maioria dos organismos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* como um exemplo bem caracterizado. As setas vermelhas tracejadas indicam a inibição por retroalimentação (feedback) pela arginina. A seta azul indica a regulação da NAGK pela proteína sinalizadora PII (em azul e em destaque) em organismos fotossintéticos. Fonte: Gil-Ortiz *et al.*, 2010.

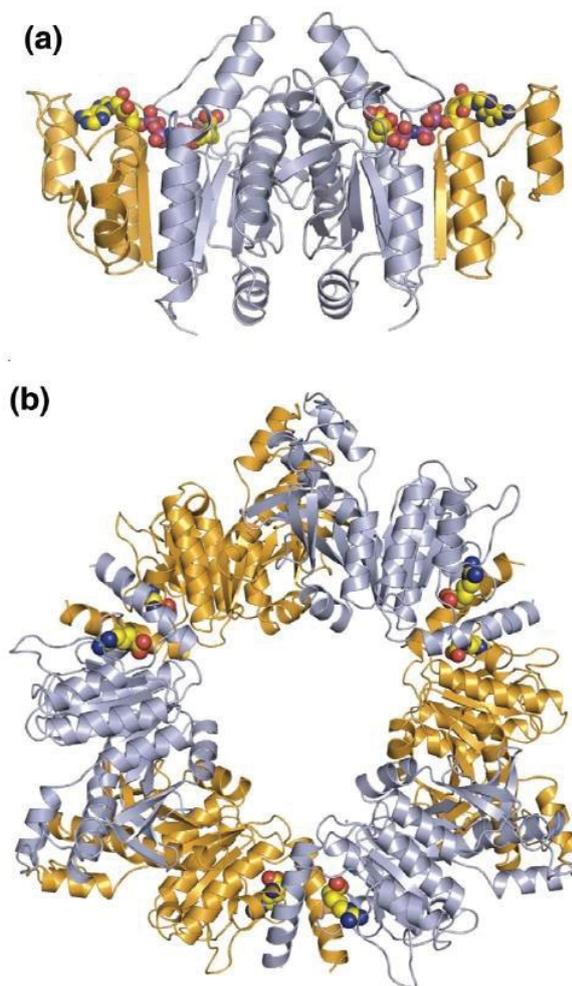
### 2.9. A retroinibição da NAGK por arginina.

A atividade da enzima NAGK é um ponto central na regulação da biossíntese de arginina em muitos organismos, como leveduras, algas, plantas e diversas bactérias, sendo frequentemente inibida por retroalimentação pelo produto final, a arginina. Em organismos como *T. maritima* e *P. aeruginosa*, NAGK é fortemente inibida por arginina, funcionando como o principal ponto de controle da via, e essa inibição está associada à estrutura de oligomerização hexamérica da enzima (figura 8), que permite uma resposta sigmoideal à concentração de arginina (Fernández-Murga *et al.*, 2004; Fernández-Murga & Rubio, 2008).

Em contraste, em *E. coli*, NAGK é insensível à arginina devido à sua estrutura dimérica (figura 8), e o controle por retroalimentação ocorre na enzima anterior da rota, a N-acetilglutamato sintase (NAGS) (Fernández-Murga *et al.*, 2004; Fernández-Murga & Rubio, 2008; Ramón-Maiques, 2002).

A sensibilidade da NAGK à arginina está relacionada à presença de uma extensão N-terminal composta por 16 a 25 resíduos de aminoácidos, exclusiva das enzimas reguladas por arginina (Fernández-Murga *et al.*, 2004; Ramón-Maiques *et al.*, 2002; Ramón-Maiques *et al.*, 2006). Estudos de mutagênese em NAGK de *E. coli* observaram que essa região adicional forma uma hélice, conhecida como N-hélice, que permite a oligomerização de três homodímeros em um hexâmero funcional. Além disso, mutações em resíduos específicos dentro dessa região, como E17, R24 e E19, modulam a afinidade da enzima pela arginina, demonstrando que a N-hélice atua como mediadora da transmissão do sinal de inibição e estabelece a cinética sigmoide típica dessa regulação (Ramón-Maiques *et al.*, 2002). Em *Corynebacterium glutamicum*, resíduos entre as posições 18 e 23 da N-hélice são críticos para a inibição, e a arquitetura hexamérica é importante para a cooperação positiva na inibição, mas não é o único determinante da sensibilidade à arginina. Assim, a extensão N-terminal é um elemento-chave, mas sua função depende de uma rede de interações estruturais específicas para garantir a regulação eficiente da NAGK por arginina (Fernández-Murga *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2011). Por outro lado, as enzimas NAGK insensíveis à arginina, como a de *E. coli*, permanecem na forma dimérica (figura 8) (Fernández-Murga & Rubio, 2008; Slocum, 2005). A organização hexamérica e a presença das N-hélices são fundamentais para que a NAGK atue como reguladora da via biossintética, sendo inibida por arginina e exibindo uma cinética sigmoide em resposta a esse aminoácido (Maheswaran *et al.*, 2004; Fernández-Murga *et al.*, 2004; Fernández-Murga e Rubio, 2008).

Assim, em concentrações de arginina abaixo de determinado limiar, que varia conforme o organismo, a enzima permanece ativa, permitindo a continuidade da síntese de arginina. No entanto, quando esse limite é ultrapassado, a atividade da NAGK é abruptamente inibida, interrompendo a produção do aminoácido (Llácer *et al.*, 2008).



**Figura 8 – Representação de duas formas oligoméricas observadas da enzima NAGK.** A) Representação do dímero de NAGK insensível à arginina de *E. coli*, ligada à AMPPNP (análogo ao ATP) e NAG. Em cinza domínios C-terminais e em amarelo domínios N-terminais de cada subunidade. B) Representação do hexâmero de NAGK sensível à arginina de *Thermotoga maritima* ligado à arginina. Três subunidades são representadas em cinza e as outras três em amarelo. Fonte: Adaptado de Liácer *et al.*, 2008.

A inibição por arginina, juntamente com a ativação por glutamato, representa um ponto-chave na regulação da síntese de arginina (Shargool *et al.*, 1988). Além disso, uma terceira forma de controle também exerce papel essencial; a ativação da NAGK pela proteína PII.

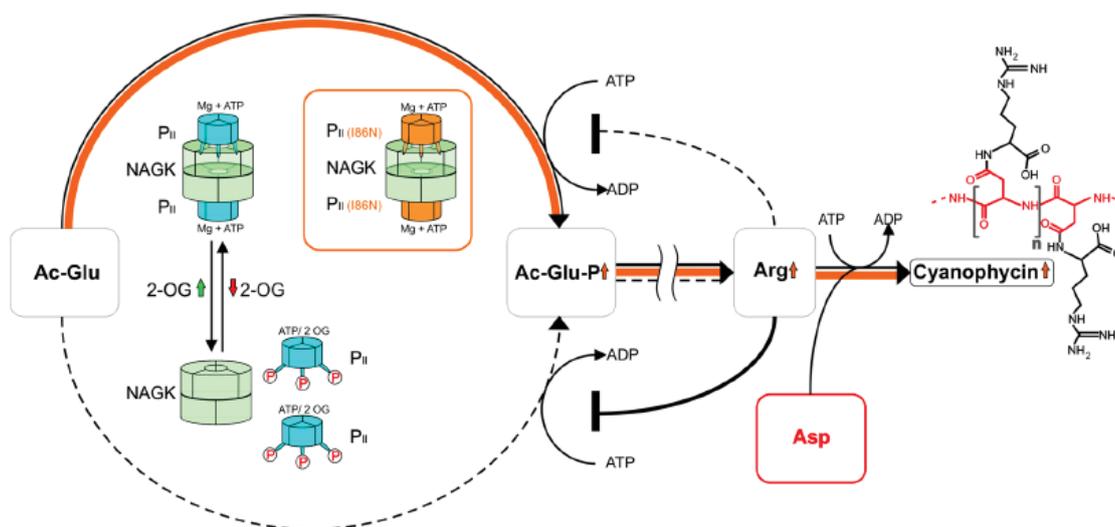
### 2.10. NAGK e a interação com as proteínas PII

Como mencionado no tópico anterior, a NAGK hexamérica é sensível e inibida por arginina (Slocum, 2005; Cunin *et al.*, 1986; Maheswaran *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Essa inibição ocorre em um sítio alostérico na enzima, ou seja, fora do sítio catalítico de fosforilação do NAG. Próximo a esse sítio alostérico, encontra-se uma região de ligação para a proteína PII. Quando PII se associa à NAGK, provoca uma mudança conformacional que reduz a afinidade da enzima pela arginina. Como resultado, mesmo na presença de altas

concentrações de arginina, a ligação do inibidor é impedida e a atividade catalítica da NAGK é mantida (Beez *et al.*, 2009; Llácer *et al.*, 2007; Llácer *et al.*, 2008; Maheswaran *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2007; Watzer *et al.*, 2015).

Estudos realizados por Watzer *et al.* (2015) com um mutante contendo a variante da proteína PII (I86N) em *Synechocystis sp.* PCC 6803 demonstraram que essa variante é capaz de se ligar de forma constitutiva à NAGK, mesmo sob condições de limitação de nitrogênio. Essa ligação constante resultou na ativação permanente da enzima, independentemente do *status* nitrogenado da célula. Como consequência, a via de biossíntese da arginina permaneceu ativa, levando a um acúmulo intracelular de arginina até 15 vezes maior em relação à cepa selvagem. Esse excesso de arginina, por sua vez, promoveu uma superprodução de cianoficina, confirmando que a interação entre PII e NAGK regula não apenas a atividade enzimática, mas também a sensibilidade da NAGK à inibição alostérica por arginina.

Essa dinâmica está ilustrada na figura 9 por Watzer *et al.* (2015) que mostra que a conversão de NAG em NAGP depende da interação com a proteína PII. Na cepa selvagem, a NAGK livre tem baixa atividade e é altamente inibida por arginina, mas, ao se ligar à PII torna-se mais ativa e menos sensível à inibição. Já na cepa BW86, a variante PII(I86N) se liga permanentemente à NAGK, ativando fortemente a enzima e liberando-a da inibição por arginina, o que permite o acúmulo do aminoácido e subsequente síntese de cianoficina a partir de arginina e aspartato.

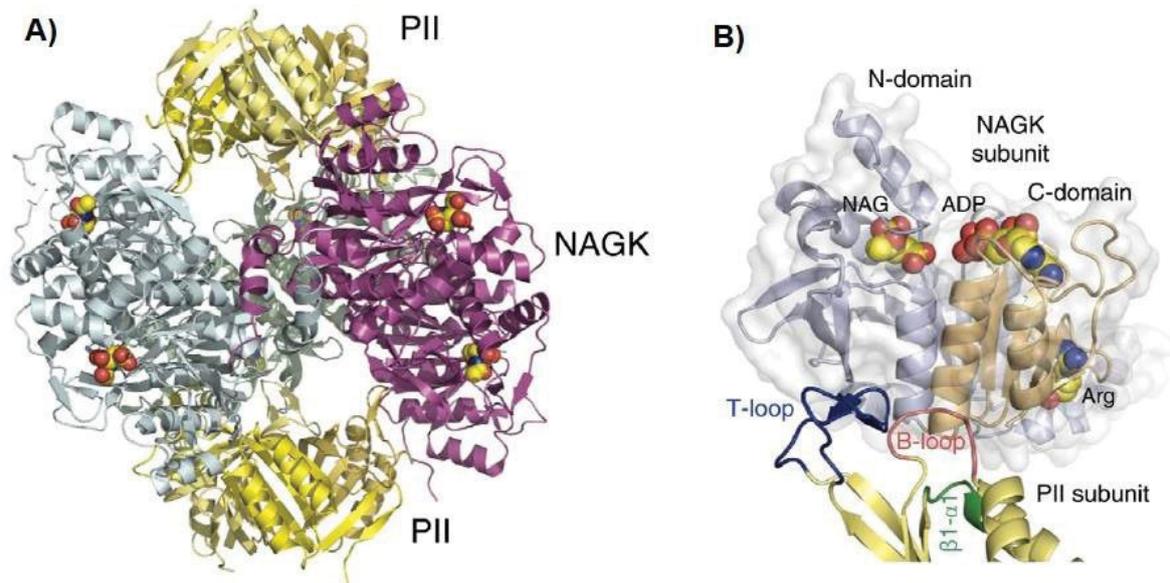


**Figura 9- Comparação entre mutante de PII(I86N) e forma selvagem na liberação da inibição de arginina da enzima NAGK em *Synechocystis sp.* PCC 6803 para superprodução de arginina e cianoficina.** NAGK catalisa a conversão de NAG em NAGP, etapa chave da via. Sua atividade é modulada pela proteína sinalizadora PII em resposta ao estado energético e ao nível de 2-oxoglutarato (2-OG). Linhas pretas pontilhadas representam a condição de 2-OG elevado, na qual a

PII não interage com NAGK, levando à inibição da enzima por arginina. Linhas contínuas indicam a condição de 2-OG baixo e ATP/Mg<sup>2+</sup> disponível, quando a PII se associa à NAGK, ativando sua atividade e promovendo o acúmulo de NAGP e conseqüentemente, arginina e cianoficina. A adição da linha laranja é devido ao mutante de PII desenvolvido no trabalho de Wazter e colaboradores (2015) para estar sempre ligada a NAGK e induzir a maior produção de arginina. A arginina e o aspartato (Asp) atuam como reguladores negativos adicionais da via. Fonte: Wazter *et al.*, 2015.

De forma consistente com esses achados, na cianobactéria *Synechococcus elongatus*, em condições de excesso de nitrogênio, a proteína PII em sua forma não fosforilada se liga à NAGK no sítio alostérico normalmente ocupado pela arginina. Essa ligação impede que a arginina exerça seu efeito inibitório, permitindo que a enzima mantenha sua atividade catalítica na fosforilação de NAG em NAGP (Heinrich *et al.*, 2004). Em contraste, sob escassez de nitrogênio, ocorre acúmulo de 2-oxoglutarato (2-OG), que em conjunto com ATP se liga à PII, promovendo alterações conformacionais na região do *loop* T da proteína e, conseqüentemente, a dissociação do complexo PII–NAGK (Maheswaran *et al.*, 2004). Além disso, a fosforilação da PII mediada por 2-OG e a ligação de ADP à proteína impedem a formação do complexo regulador em cianobactérias, bloqueando sua capacidade de ativar a NAGK (Heinrich *et al.*, 2004; Burillo *et al.*, 2004; Maheswaran *et al.*, 2004).

O complexo formado entre PII e NAGK é composto por dois trímeros de PII que envolvem um hexâmero de NAGK formado por três dímeros, organizando-se em uma estrutura simétrica (figura 10). Cada subunidade de PII interage com uma subunidade oposta de NAGK, principalmente por meio dos loops B e T da proteína PII (figura 10) (Llácer *et al.*, 2007). Essas interações ocorrem em regiões afastadas dos sítios de ligação de arginina e dos substratos da NAGK. Nessa configuração, o *loop* T da PII permanece em uma conformação compacta, estabilizando o complexo. No entanto, a ligação de ADP à PII favorece a forma estendida do *loop* T, promovendo a dissociação do complexo PII–NAGK em *Synechococcus elongatus* (Maheswaran *et al.*, 2004).



**Figura 10 - Complexo entre PII e NAGK de *S. elongatus*.** A) Hexâmero de NAGK ligado à PII, os dímeros são representados pelas cores cinza claro, cinza escuro e roxo, os trímeros de PII estão representados em amarelo. B) Envolvimento dos *loops* B e T na formação do complexo NAGK-PII. Fonte: Adaptado de Llácer *et al.*, 2008.

Apesar das semelhanças estruturais, as enzimas NAGK de cianobactérias e de plantas apresentam diferenças funcionais importantes, incluindo variações significativas na forma como interagem com a proteína PII (Llácer *et al.*, 2008). Uma dessas diferenças envolve a sensibilidade à presença de ADP na formação do complexo PII–NAGK. Na cianobactéria *S. elongatus*, o ADP inibe fortemente a formação do complexo entre SePII e NAGK. Em contraste, na planta *Arabidopsis thaliana*, a proteína AtPII mantém sua interação com AtNAGK mesmo na presença de altas concentrações de ADP, indicando uma associação muito mais estável e menos sensível a essa molécula (Chellamuthu *et al.*, 2014). Além disso, em muitas plantas superiores, a regulação da interação entre NAGK e PII também é modulada diretamente pela glutamina, graças à presença do *loop* Q, específico dessas proteínas vegetais. Esses dados sugerem que plantas e cianobactérias evoluíram estratégias distintas para integrar sinais energéticos e nitrogenados na regulação da interação entre PII e NAGK (Maheswaran *et al.*, 2004).

Apesar dessas diferenças funcionais, Beez *et al.* (2009) demonstraram que a proteína SePII de *S. elongatus* é capaz de interagir funcionalmente com a AtNAGK de *A. thaliana*, indicando que, ao menos em parte, as proteínas PII de bactérias e eucariotos podem ser funcionalmente intercambiáveis. Considerando que cerca de 1,2 bilhões de anos de evolução separam cianobactérias de plantas (Sheveleva e Hallick, 2004), essa conservação funcional reforça a hipótese de que há uma forte pressão seletiva para manter a interação entre PII e NAGK. Controlar a biossíntese de arginina em organismos fototróficos por meio da percepção

de sinais energéticos como a razão ATP/ADP, e de sinais relacionados ao metabolismo carbono/nitrogênio como o 2-oxoglutarato parece ser de importância central para a regulação metabólica desses organismos (Ferrario-Mery *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que todas as interações conhecidas entre PII e NAGK ocorrem em organismos cujas as enzimas NAGK são hexaméricas e sensíveis à inibição por arginina. Por outro lado, em *E. coli*, a NAGK é dimérica, insensível à arginina, e até o momento não há evidências de interação com a proteína PII. Com base nisso, Maheswaran *et al.* (2004) sugerem que a estrutura hexamérica da enzima é um requisito essencial para sua interação com PII. Além disso, dos cinco resíduos considerados essenciais para a interação com PII (Llácer *et al.*, 2007), dois estão presentes na NAGK de *A. brasilense*, enquanto nenhum é encontrado na enzima de *E. coli*, sugerindo que a NAGK de *A. brasilense* é mais próxima funcionalmente das enzimas cianobacterianas, o que aumenta a possibilidade de que também interaja com a proteína PII (Gerhardt, 2015).

Os estudos mais recentes sobre a interação entre NAGK e proteínas PII, excluindo aqueles envolvendo cianobactérias, incluem o trabalho de Gerhardt *et al.* (2020), que, até o momento, constitui o único registro da formação de um complexo NAGK–PII em *Azospirillum brasilense* (AbGlnZ). Este achado representa o dado central para o presente estudo. Outras investigações abordaram organismos não fotossintetizantes, como o estudo de Selim *et al.* (2020) com *Polytomella parva*, uma alga que perdeu a capacidade fotossintética, e o de Xu *et al.* (2020) com *Corynebacterium glutamicum*, uma bactéria gram-positiva. Mais recentemente, Vlaslova *et al.* (2025) descreveram a interação NAGK–PII na alga *Micromonas pusilla*, a qual, entretanto, é fotossintetizante. Dessa forma, a observação da interação entre PII e NAGK em um organismo gram-negativo não fotossintetizante, como *A. brasilense* descrita por Gerhardt *et al.* (2020), representa um evento evolutivo inédito.

### 3. JUSTIFICATIVA

A NAGK catalisa a primeira etapa regulatória da via de biossíntese da arginina a partir do glutamato em organismos que realizam o ciclo de síntese de ornitina. A arginina, por sua vez, é um aminoácido essencial não apenas para a síntese proteica, mas também como um importante reserva intracelular de nitrogênio. Na literatura, a NAGK está amplamente caracterizada em organismos fotossintetizantes, como algas verdes e cianobactérias, incluindo a descrição de sua interação e formação de complexos com proteínas da família PII.

No entanto, pouco se sabe sobre a caracterização dessa enzima e sua interação com PII em organismos não fotossintetizantes. Entre os estudos mais recentes nesse contexto, destaca-se o trabalho de Gerhardt *et al.* (2020), que constitui o único registro da formação de um complexo NAGK–PII em *A. brasilense* (AbGlnZ), achado central para o presente estudo. Outras investigações abordaram diferentes organismos não fotossintetizantes, como o estudo de Selim *et al.* (2020) com *Polytomella parva*, uma alga que perdeu a capacidade fotossintética, e o de Xu *et al.* (2020) com *Corynebacterium glutamicum*, uma bactéria Gram-positiva e recentemente, Vlaslova *et al.* (2025) descreveram a interação NAGK–PII na alga *Micromonas pusilla*, a qual, entretanto, é fotossintetizante.

Entre os organismos não fotossintetizantes com interação PII bem descrita, destaca-se *E. coli*, cuja NAGK apresenta-se na forma dimérica e insensível à arginina. Em contraste, a NAGK de *A. brasilense* é observada como hexamérica e sensível à arginina, característica que, segundo a literatura, favorece a interação com proteínas PII como observado por Gerhardt *et al.* (2020) na presença de ATP, com formação de complexo entre NAGK e GlnZ.

Dessa forma, a observação da interação entre PII e NAGK em um organismo gram-negativo não fotossintetizante, como *A. brasilense*, representa um evento evolutivo inédito. Diante desse contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a NAGK de *A. brasilense* e investigar sua possível interação com as proteínas PII (GlnB e GlnZ), bem como com metabólitos-chave da via de biossíntese da arginina.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Caracterizar a enzima N-acetil-l-glutamatoquinase (NAGK) de *A. brasilense* quanto a sua atividade enzimática, estrutura, e sua possível interação com as proteínas PII do mesmo organismo (GlnZ e GlnB) e determinar metabólitos importantes da via.

### 4.2 Objetivos específicos

- ✓ Expressar e purificar a proteína NAGK de *A. brasilense*;
- ✓ Expressar e purificar as proteínas PII GlnB e GlnZ de *A. brasilense*;
- ✓ Verificar o estado de oligomerização da enzima NAGK;
- ✓ Caracterizar a enzima NAGK através de ensaios cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ , pH ótimo, temperatura ótima e cofatores);
- ✓ Avaliar a interação da NAGK e PII na presença de diferentes efetores;

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Bactérias e plasmídeos

As bactérias e plasmídeos utilizados no trabalho estão demonstrados na tabela 1 a seguir.

**Tabela 1. Bactérias e plasmídeos utilizados no presente trabalho.**

<i>Escherichia coli</i>	Característica	Referência
BL21 (λDE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal(λclts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	Sambrook; Fritsch,; Maniatis, (1989)
DH10B	Smr, F'[proAB+lacZΔM15]	Sambrook; Fritsch,; Maniatis, (1989)
Plasmídeo	Característica	Referência
pARSS_NAGKTEV	Amp <sup>r</sup> (pTEV5). Expressa <i>A. brasilense</i> G8A164 NAGK-his ( <i>argB</i> N-Acetylglutamate kinase)	Santos A. R. S. (dados não publicados)
pLMA1	Km <sup>r</sup> (pET28a). Expressa <i>A. brasilense</i> GlnB 6xHis-tag	Huergo <i>et al.</i> , (2007)
pMSA3	Km <sup>r</sup> (pET28a). Expressa <i>A. brasilense</i> GlnZ-His-tag.	Araújo <i>et al.</i> , (2004)
pLH25PET	Km <sup>r</sup> (pET28a). Expressa <i>A. brasilense</i> GlnB nativa	Huergo <i>et al.</i> , (2005)
pMSA4	Km <sup>r</sup> (pET28a). Expressa <i>A. brasilense</i> GlnZ nativa	Araújo <i>et al.</i> , (2004)
pTEV5	Amp <sup>r</sup> Vetor de expressão, cauda His seguido do sítio de clivagem	Rocco <i>et al.</i> (2008)
pJNL1NAGK	Km <sup>r</sup> (pET29a). Expressa <i>A. brasilense</i> G8A164 NAGK nativa ( <i>argB</i> N-Acetylglutamate kinase) NAGK	Este trabalho
pET29a	Km <sup>r</sup> vetor de expressão vazio promotor T7 gene lac	Este trabalho

### 5.2. Meios de cultura

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C, sendo utilizados os meios Luria-Broth (LB) de acordo com Sambrook *et al.*, (1989). Também foi utilizado o meio LA (Sambrook *et al.*, 1989): meio LB + 15 g/L de ágar.

### 5.3. Antibióticos

Foram utilizados os antibióticos Ampicilina (Amp<sup>r</sup>) 250 µg/mL e Canamicina (Km<sup>r</sup>) 250µg/µL para *E. coli*, com as soluções estoque preparado de acordo com Sambrook *et al.*, (1989).

#### **5.4. Purificação de DNA plasmidial por lise alcalina (Minipreparação)**

A extração de plasmídeos foi realizada segundo o método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Aproximadamente 3 mL de uma cultura de *E. coli* Top 10 (DH10B) contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas por 16h *overnight* a 37°C, depois centrifugada a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorf), por 60 segundos. O precipitado foi então ressuspenso em tampão GET (50mM de glucose, 25 mM de Tris HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA), com adição de 0,3% (v/v) RNase (2 mg/ml). A lise celular foi realizada com 1% de SDS e 0,2 M de NaOH. As proteínas e o DNA cromossomal foram precipitados com uma solução de Kacf (acetato de potássio 3 M, pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 M) durante 10 minutos em banho de gelo. Então foi adicionado 200uL de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado em vórtex e centrifugado a 13.000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo onde foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol, e mantido em gelo durante 5 minutos. A amostra foi centrifugada novamente a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorff), durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500uL etanol 70% e centrifugado novamente a 13.000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi seca em estufa, a 37°C, durante uma hora. Em seguida foi ressuspenso em água e congelado em freezer a -20°C.

#### **5.5 Separação de fragmentos de DNA via eletroforese em gel de agarose**

A separação dos fragmentos de DNA e plasmídeos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% preparada em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989). As amostras foram homogeneizadas com tampão de amostra (loading dye) e aplicadas nos poços do gel. Como referência, foi corrido em paralelo um marcador de peso molecular de DNA do tipo 1 kb DNA Ladder. A corrida eletroforética foi conduzida a 80 V por 60 minutos, permitindo a migração diferencial dos fragmentos de DNA com base em seu tamanho molecular. Após a separação, o DNA foi visualizado por fluorescência sob luz ultravioleta, utilizando brometo de etídio incorporado ao gel na concentração de 0,5 µg/mL.

#### **5.6 Subclonagem do plasmídeo da NAGK nativa**

A fim de obtermos uma proteína NAGK sem cauda de poli histidina, foi realizada a subclonagem do gene *argB* a partir do plasmídeo pARSS\_NAGKTEV para o vetor de expressão pET29a. Os plasmídeos pARSS\_NAGKTEV e pET29a foram purificados por minipreparação e submetidos, individualmente, a uma digestão com as enzimas de restrição BamHI (5'-GGATCC-3') e NdeI (5'-CATATG-3') em uma reação dupla, utilizando o tampão TANGO 10X (Thermo Scientific), em um volume final de 20 µL. Foram utilizados de 0,5 a 1 µg de DNA, 2 µL de tampão TANGO 10X, 5 a 10 unidades de cada enzima de restrição, e o volume restante foi completado com água Milli-Q. As reações foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para verificar a eficiência da digestão, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

Após a confirmação da digestão enzimática por eletroforese, os fragmentos de interesse foram purificados a partir do gel de agarose utilizando um kit comercial de purificação de DNA (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). A reação de ligação foi realizada utilizando T4 DNA ligase (Thermo Scientific), em uma razão molar vetor: inserto de aproximadamente 1:3, em um volume final de 20 µL. A mistura foi composta por 50 ng de vetor linearizado, o inserto correspondente, 2 µL de tampão de ligação 10X, 1 µL de T4 DNA ligase (5 U/µL) e água Milli-Q para completar o volume. A reação foi incubada a 16 °C durante a noite (*overnight*) para promover a ligação dos fragmentos, e na sequência inserida em *E. coli* Top10 transformada por choque térmico. O plasmídeo resultante (pET29a + *argB*) foi nomeado pJNL1NAGK.

### **5.7 Transformação bacteriana por choque térmico**

Células competentes de *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) ou Top10, preparadas previamente por método de cloreto de cálcio segundo Dagert & Ehrlich (1979), foram transformadas com os plasmídeos de interesse. Foram adicionados de 1 a 5 µL de DNA a 100 µL de células competentes, com incubação no gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico a 42 °C por 45 segundos e retorno imediato ao gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 1mL de meio LB, e a cultura foi incubada a 37 °C por 45 minutos para recuperação celular. Após esse período, 100 a 200 µL da suspensão celular foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com antibiótico kanamicina 50 µg/mL), e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 a 18 horas.

### **5.8 Triagem dos clones recombinantes**

Para a confirmação da obtenção de clones resultantes da subclonagem (item 5.6), as colônias obtidas após a transformação foram selecionadas com base na resistência ao

antibiótico presente nas placas. Colônias individuais foram inoculadas em meio LB líquido suplementado com antibiótico e incubadas a 37 °C com agitação de 120 rpm durante a noite por 16 horas. Os plasmídeos foram extraídos por minipreparação e inicialmente submetidos a digestão enzimática com BamHI e NdeI para verificar a presença e o tamanho do inserto. Em seguida, os plasmídeos positivos foram utilizados como molde em reações de PCR com o *primer* T7, com o objetivo de amplificar o fragmento clonado e obter maior quantidade de DNA para visualização. Os produtos da digestão e da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, permitindo a confirmação dos clones recombinantes.

### 5.9 Expressão e Purificação das proteínas de interesse

As estirpes de *E. coli* BL21(λDE3) contendo os plasmídeos de interesse foram cultivadas em meio LB suplementado com o antibiótico apropriado. O pré-inóculo foi incubado a 37 °C, sob agitação (120 rpm), por aproximadamente 16 horas. Em seguida, foi inoculado na proporção de 1:50 (v/v) em 400 mL de meio LB e incubado até que a densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) atingisse valores entre 0,4 e 0,7. A expressão das proteínas foi induzida pela adição de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG).

Para a NAGK de *A. brasilense* (abNAGK), a indução foi realizada com 0,05 mM de IPTG, a 20 °C, por 20 horas. Para as proteínas PII, 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl foram adicionados ao meio do pré-inóculo com o objetivo de evitar a uridililação das proteínas. A indução foi conduzida com 0,5 mM de IPTG, a 37 °C, por 3 horas. Após a indução, as culturas foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 20.000 × g por 20 minutos a 4 °C. Os pellets celulares foram congelados ou diretamente ressuspensos em tampão de lise para a extração proteica.

Para a purificação, as células foram ressuspensas em tampão de sonicação adequado (NAGK-His: 50 mM Tris HCl, pH 7,5; NAGK-wt: 50 mM Tris HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl; PII: 50 mM Tris HCl, pH 8,0, 100 mM KCl) e lisadas por sonicação em banho de gelo. O extrato bruto foi centrifugado a 20.000 × g, por 20 minutos, a 4 °C, para separação das frações solúvel e insolúvel.

Para a abNAGK-His, utilizou-se uma coluna de afinidade HisTrap HP Ni-NTA de 1 mL (Cytiva®). A coluna foi equilibrada com 10 mL do tampão A (50 mM Tris HCl, pH 8,0) e a proteína foi eluída com um gradiente crescente de imidazol no tampão B (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 M imidazol).

AbNAGK nativa (wild-type) foi purificada por cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap Q 1 mL (Cytiva®), equilibrada com 10 mL do tampão A (50 mM Tris HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl). A eluição foi realizada com um gradiente crescente de NaCl no tampão B (50 mM Tris

HCl, pH 7,5, 1 M NaCl).

As proteínas PII foram purificadas conforme descrito por Moure *et al.* (2012). O extrato proteico clarificado foi aplicado em coluna HiTrap Heparina 1 mL (Cytiva®), equilibrada com tampão A (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 20 mM imidazol). A eluição foi realizada com um gradiente crescente de KCl no tampão B (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 100 mM KCl).

Para as variantes de PII com cauda de histidina, foi utilizada a coluna HisTrap HP Ni-NTA de 1 mL, equilibrada com tampão A (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 100 mM KCl), sendo a eluição realizada com gradiente crescente de imidazol no tampão B correspondente (mesma composição do tampão A, acrescido de 1 M imidazol).

### **5.10 Separação de proteínas por eletroforese SDS - PAGE**

O perfil eletroforético das proteínas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis com concentrações de acrilamida entre 10% a 15%, dependendo do peso molecular das proteínas de interesse. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com azul de Coomassie para visualização das bandas proteicas.

### **5.11 Diálise**

Após a purificação, as frações contendo maior quantidade de proteína (com maior pureza) foram agrupadas e submetidas à diálise para remoção do excesso de eluente (Imidazol, KCl ou NaCl). A diálise foi realizada utilizando membranas SnakeSkin™ (Thermo Scientific) com poro de corte de 10 kDa, apropriadas para retenção da proteína NAGK e PII.

As amostras foram dialisadas em tampão A (adequado a cada proteína), sob agitação suave a 4 °C. Foram realizadas três trocas do tampão ao longo do dia, com intervalos de aproximadamente 3 a 4 horas entre cada troca, com última etapa em diálise *overnight* (aproximadamente 16 horas) sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após a diálise, as amostras foram coletadas, centrifugadas para remoção de eventuais precipitados, aliqotadas e armazenadas a 4 °C ou -20°C.

### **5.12 Quantificação de proteínas**

A quantificação protéica foi realizada pelos métodos de espectrofotometria ou coloração com reagente de Bradford.

Por espectrofotometria, foi utilizado o método para proteína específica no aparelho NanoDrop 2000® da Thermo Scientific, com o coeficiente de extinção molar da proteína, e o peso molecular obtidos através da página da *web ProtParam*

(<https://web.expasy.org/protparam/>) de acordo com a sequência específica de aminoácidos específicos da proteína. Para a NAGK foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 12950 e MW de 32 kDa, para a GlnB o coeficiente de extinção molar de 2980 e MW de 12,371 kDa e para a GlnZ o coeficiente de extinção molar de 4470 e MW de 12,272 kDa.

Para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), foi utilizado reativo de Bradford comercial, seguindo as recomendações do fabricante. A curva de calibração foi realizada com concentrações de BSA (Albumina de Soro Bovino), do inglês (*Bovine Serum Albumin*) variando de 20 a 100µg/mL. A absorbância foi medida a 595 nm.

### **5.13 Remoção da cauda de histidina 6x com protease TEV**

Para a remoção da cauda de 6 histidinas da proteína NAGK-his, a protease TEV foi gentilmente cedida pelo doutorando Marcelo Conzentino e usada na proporção de 9:1 de AbNAGK purificada, para a TEV purificada. O tampão utilizado foi Tris HCl 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM, DTT 1 mM. A mistura foi incubada a 8°C por 20 horas (Santos *et al.*, 2018). Após a digestão enzimática, a reação foi carregada em coluna HisTrap *Chelating* para remoção da protease e separação de abNAGK. A clivagem foi verificada por eletroforese SDS-PAGE.

### **5.14 Ensaio de co-precipitação in vitro (pull down)**

A fim de verificarmos a formação de complexo entre as proteínas PII e NAGK, foram realizados ensaios de interação *in vitro* com imobilização das proteínas com Histag em *beads* magnéticas (*MagneHis beads* Promega®), como descrito por Gerhardt *et al.* 2020. As reações foram realizadas em tampão Tris HCl 50mM pH 8.0, 0,1 M NaCl, 10% de glicerol, imidazol 20 mM, e 1mM de MgCl<sub>2</sub> na presença ou ausência de efetores de como ATP, ADP e 2-OG de acordo com cada experimento.

### **5.15 Fotometria de Massas**

Para o ensaio de fotometria de massas, os tampões foram filtrados em filtro de 0,22µM e a amostra da proteína centrifugada por 10 minutos na rotação máxima. Foi utilizado 10nM de abNAGK-his de concentração final para as leituras no tampão A com adição de MgCl<sub>2</sub> além de moléculas efetoras para testes com ATP e NAG em concentrações molares de 10mM e 40mM respectivamente. Incubado a temperatura ambiente de 25°C quando na presença de efetores por 10 minutos. O protocolo de preparo de lâminas foi realizado segundo Wu e Piszczek (2020). Os softwares utilizados para leitura e análise foram AcquireMP® e DiscoveryMP® respectivamente.

### 5.16 Ensaios Cinéticos da atividade da NAGK

A avaliação dos parâmetros cinéticos da enzima NAGK foram realizados segundo Beez *et al.*, (2009). O ensaio monitora a fosforilação do NAG, em ensaio acoplado com piruvato quinase e lactato desidrogenase, e mensura a oxidação de NADH a NAD<sup>+</sup>. A reação foi composta de 50mM de imidazol pH 7,5, 50mM de KCl, 20mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM de NADH, 1mM de fosfoenolpiruvato, 10mM de ATP, 0,5mM DTT, 11U de lactato desidrogenase, 15U de piruvato quinase, 50mM de NAG, e 7,1 nM de NAGK-his.

A reação foi monitorada em espectrofotômetro por 10 minutos no comprimento de onda de 340nm, sendo acompanhada a conversão de NAG em NAGP, liberando ADP e NADH em mmol por minuto. Os valores para o *k<sub>cat</sub>* foram calculados a partir dos valores obtidos de *V<sub>max</sub>*, assim como o *K<sub>m</sub>*, *k<sub>cat</sub>*, inclinação de Hill e IC50 foi utilizado o *software* GraphPad Prism.

### 5.17 Cromatografia por exclusão de tamanho (Size Exclusion Chromatography – SEC)

A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada em um sistema ÄKTA (Cytiva) utilizando a coluna Superose 12 10/300 GL previamente equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 50 mM de NaCl. Para estimar o peso molecular aparente das proteínas eluídas, foi utilizado um padrão de calibração de massa molecular (Bio-Rad, Cat. #1511901) antes da injeção de cada amostra. Esse padrão contém uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas, incluindo a tioglobulina (670 kDa), marcada com corante vermelho para facilitar o acompanhamento da eluição, além de outras proteínas como  $\gamma$ -globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa).

A SEC foi empregada para análise do estado oligomérico das proteínas NAGK e PII purificadas individualmente, bem como para avaliação da formação do complexo NAGK–PII. Para os ensaios de interação, a coluna foi previamente equilibrada de acordo com as condições específicas de cada efector testado, e as proteínas foram misturadas e incubadas por 30 minutos a 1 hora e meia a 4 °C antes da aplicação na coluna. A eluição foi monitorada por absorbância a 280 nm, e as frações coletadas foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE.

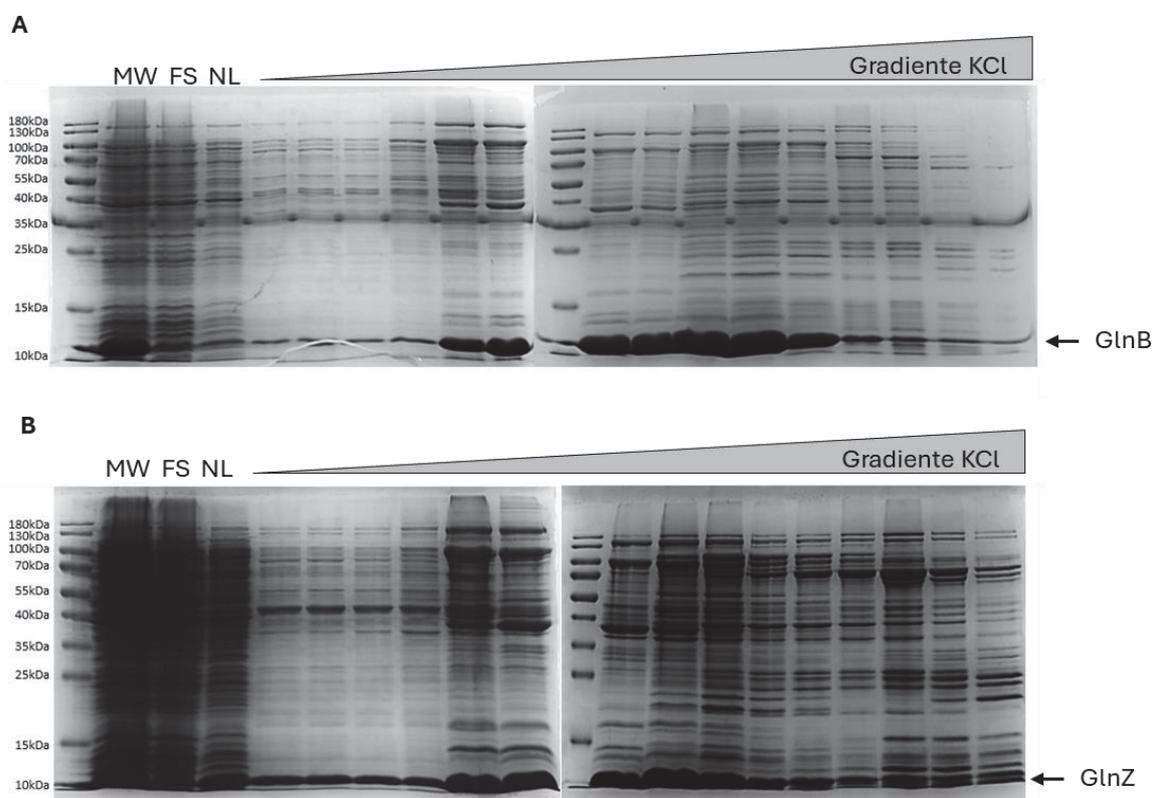
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Expressão e purificação de proteínas PII

Para as proteínas PII, ambas GlnB e GlnZ foram expressas e purificadas em suas versões nativa e com cauda de histidina, a fim de serem utilizadas em ensaios de co-precipitação (*pull-down*), ensaios de microscopia e cinética enzimática.

As proteínas PII (formas nativas e His-tag) foram purificadas conforme descrito na metodologia, a partir de culturas induzidas com 0,5 mM de IPTG e submetidas a lise por sonicação em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0 contendo 100 mM de KCl.

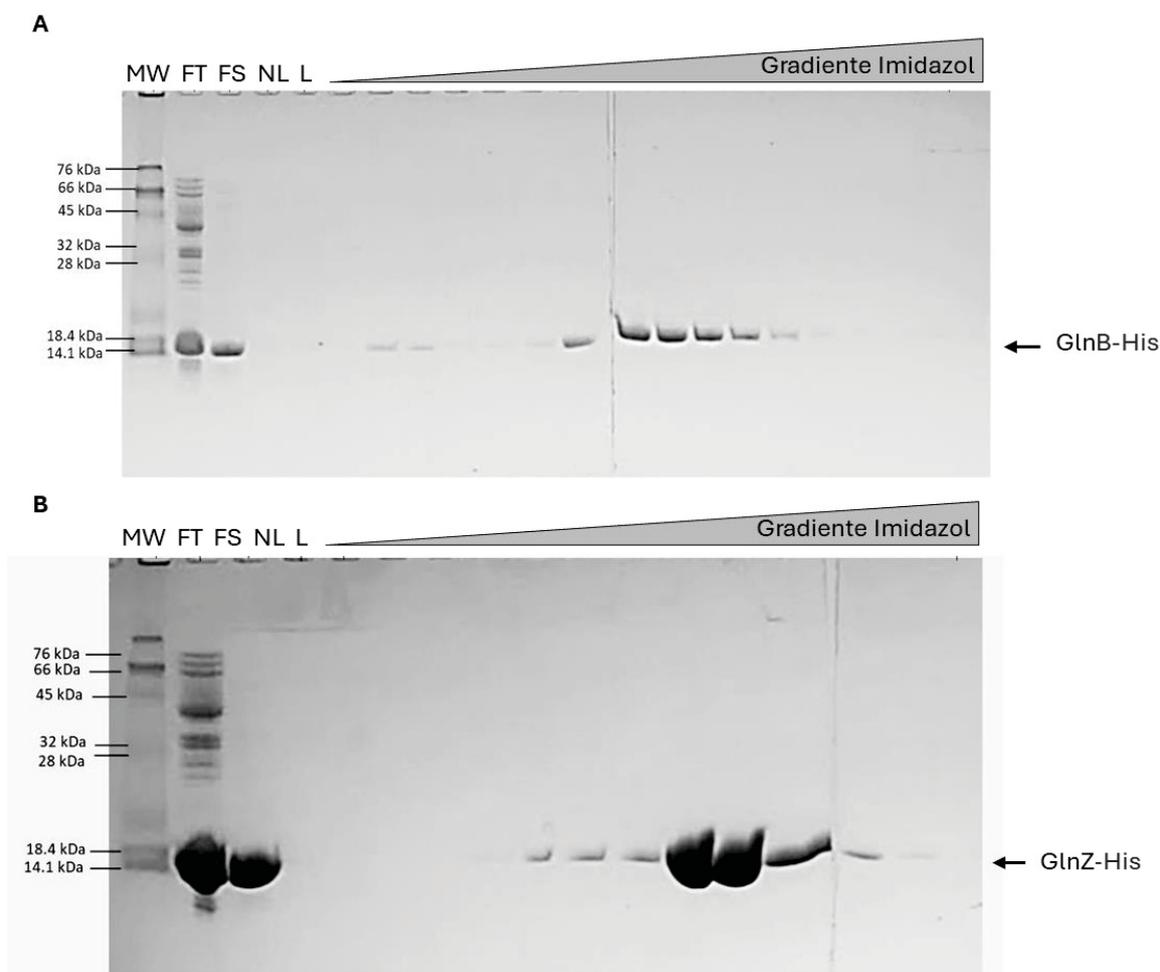
Para as PII nativas, a fração solúvel foi aplicada em coluna de heparina de 5 mL (Cytiva – HiTrap®), equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0 + 0,1M de KCl. Após coleta do flow-through e lavagem com o tampão de equilíbrio, a eluição foi realizada com concentrações crescentes de KCl (0,2 a 1 M). Para as PII com cauda de histidina, utilizou-se coluna HisTrap HP Ni-NTA 1 mL (Cytiva®), sendo a eluição conduzida com tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0 + KCl 0,1 M, e gradiente de imidazol 0,1 a 1 M. Em ambos os casos, foram coletadas frações de 1 mL, posteriormente analisadas por SDS-PAGE (Fig. 11a. GlnB nativa; Fig. 11b. GlnZ nativa; Fig. 12a: GlnB-His; Fig. 12b: GlnZ-His).



**Figura 11 – Perfil eletroforético da purificação das proteínas PII nativas em coluna de HiTrap Heparina.** A. GlnB; B. GlnZ. SDS-PAGE 14%, corado com Coomassie Blue. MW- Marcador de peso molecular; FS – Fração Solúvel; NL – Fração Não ligada (*Flow through*). Fonte: A autora.

É importante destacar que o protocolo mais utilizado para a purificação das proteínas PII de *A. brasilense*, descrito por Moure et al. (2012), inclui uma etapa de aquecimento do extrato proteico a 70 °C, visando desnaturar proteínas endógenas expressas por *E. coli* BL21.

Para a purificação das PII com cauda de histidina (figura 12), a etapa de aquecimento foi realizada, resultando em frações com maior pureza tanto para AbGlnB-his quanto para Ab-GlnZ-his, porém houve um maior rendimento para a GlnZ-his em comparação a GlnB-his.



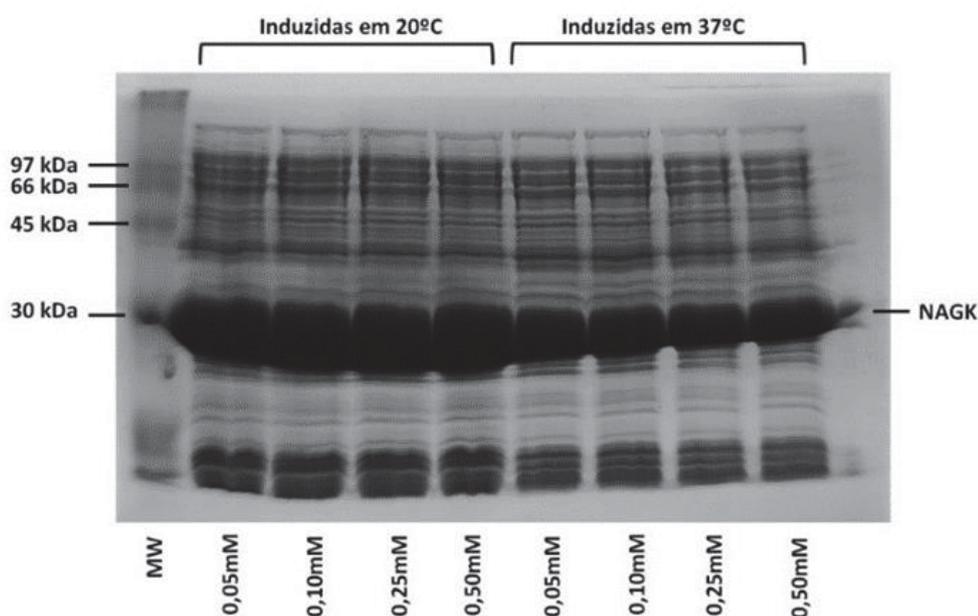
**Figura 12 - Perfil eletroforético da purificação das proteínas PII-His em coluna de afinidade HisTrap HP Ni-NTA. A. GlnB-His; B. GlnZ-His. SDS-PAGE 14%, corado com Coomassie Blue. MW- Marcador de peso molecular; FT – Fração Total; FS – Fração Solúvel; NL – Fração Não ligada (*Flow through*); L – lavagem. Fonte: A autora.**

## 6.2 Expressão, purificação e análise da enzima NAGK-His de *Azospirillum brasilense*

Para a caracterização da enzima NAGK de *A. brasilense*, a proteína foi inicialmente expressa a partir do plasmídeo pARSS\_NAGKTEV, que codifica a NAGK-His com cauda de seis histidinas na região N-terminal, utilizando o vetor pTEV5 como base. Esse plasmídeo foi construído pelo Dr. Adrian Santos durante seu doutorado (dados não publicados). Embora a

expressão fosse eficiente, a proteína apresentava alta insolubilidade.

Desse modo, foram realizados testes de expressão da enzima, para otimizar o rendimento da fração solúvel e ter bom rendimento na purificação da NAGK-his (figura 13). Foram testadas diferentes concentrações do indutor IPTG, a 20 e 37°C. Tanto as concentrações quanto as temperaturas testadas resultaram em grande quantidade de NAGK na fração solúvel (Fig. 13), embora ainda houvesse cerca de 50% da proteína na fração insolúvel (dados não mostrados). Desse modo, optamos por manter a condição de indução a 20°C por 16 horas, com 0,25mM de IPTG para a expressão de NAGK-His.

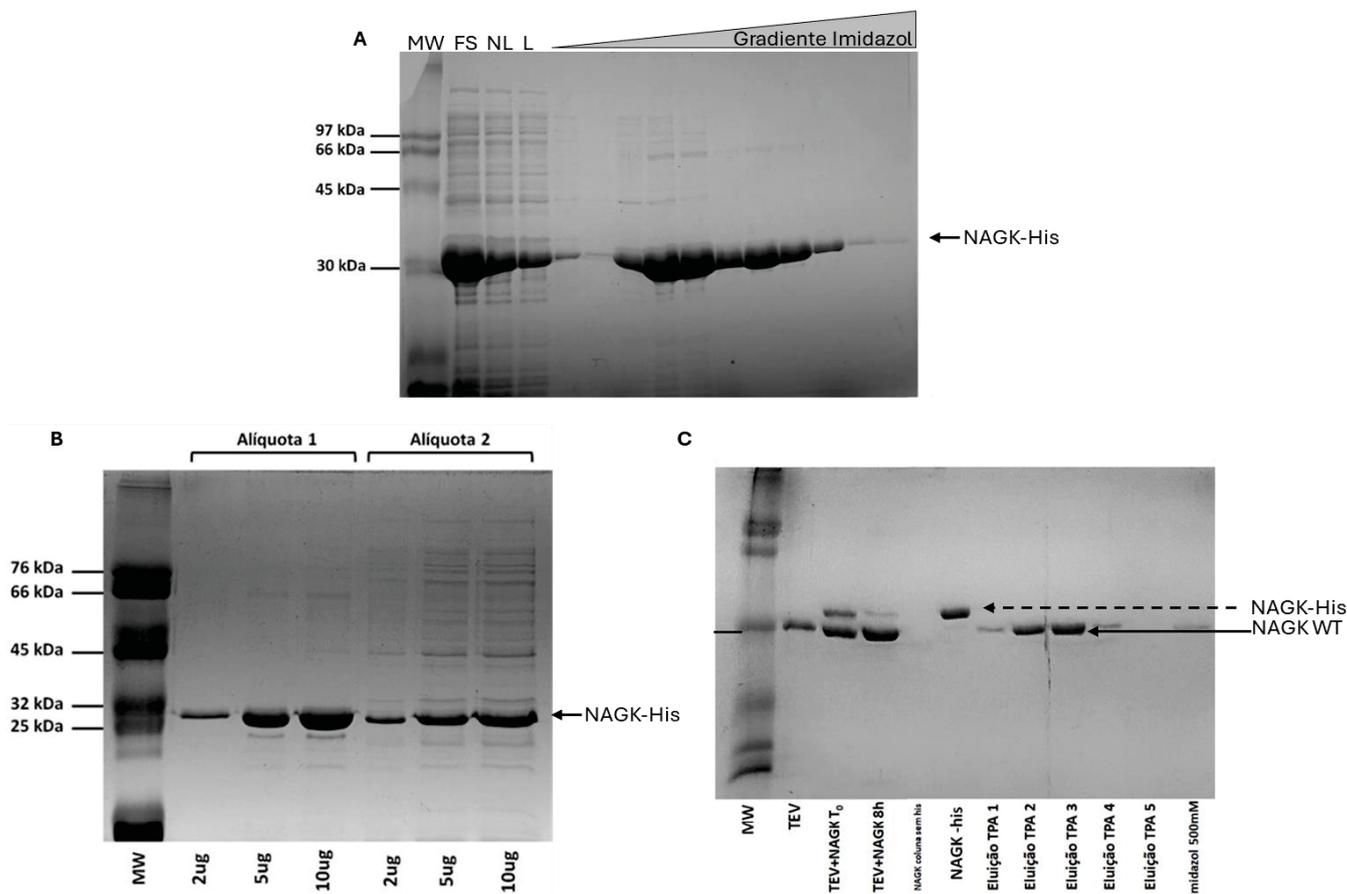


**Figura 13 – Teste de indução de NAGK-his.** Perfil eletroforético do extrato proteico de *E. coli* BL21 expressando NAGK-his induzida com a adição de 0,05mM até 0,50mM de IPTG, a 20 ou 37°C. Gel SDS-PAGE 12,5 % corado com Coomassie Blue. Fonte: A autora.

Após a indução bem-sucedida, foram avaliadas diferentes condições de tampão para a lise celular, pois, embora a proteína estivesse inicialmente presente na fração solúvel, grande parte precipitava nas etapas subsequentes. Foram testados diferentes tampões (Tris HCl, HEPES e fosfato de sódio) e concentrações de sal (NaCl e KCl). Embora para a maioria das proteínas seja usado tampão Tris HCl com adição de sal, para a NAGK-his, até as mais baixas concentrações de sal não ajudavam na solubilização da proteína e, portanto, os melhores resultados foram obtidos com tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, sem adição de sal (dados não mostrados). Diante disso, foi possível a obtenção de um protocolo satisfatório para purificação da proteína com a cauda de histidina (Fig. 14).

NAGK-his foi purificada em coluna HisTrap HP Ni-NTA de 1 mL (Cytiva®) e a proteína eluiu entre 15 a 20% de tampão B, correspondente a concentração de 150 a 200mM de imidazol (Fig. 14A). Após análise por SDS-PAGE, as frações foram separadas duas alíquotas,

de acordo como grau de pureza (Fig. 14B), e dialisadas em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5. Após a quantificação, foi obtida a concentração de 0,722  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a alíquota 1 e 0,316  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a alíquota 2.



**Figura 14 - Perfil eletroforético da preparação da enzima NAGK em SDS – PAGE 12,5 %.** A) Perfil de eluição na purificação em coluna Chelating HisTrap HP Ni-NTA de 1 mL (Cytiva®). B) Alíquotas de NAGK-his (após diálise). C) Tratamento com a protease TEV para remoção da cauda 6xhis de bNAGK. MW- Marcador de peso molecular; FS – Fração Solúvel; NL – Fração Não ligada (*Flow through*); L – lavagem. Fonte: A autora.

Desse modo, iniciamos as análises com a proteína na forma NAGK-His. O primeiro ensaio realizado foi o *pull-down* com ambas PII, a fim de reproduzirmos os dados obtidos por Araújo (2018), entretanto, nenhum complexo foi detectado em SDS-PAGE. Esse resultado, compatível com o observado por Santos (comunicação pessoal, dados não publicados), sugere que a presença da cauda de histidina pode ter interferido na interação. Em Araújo (2018), a interação por *pull-down* foi observada entre GlnZ-His e NAGK nativa, enquanto, no presente estudo, testamos NAGK-His com PII nativas, a primeira condição, em geral, apresenta melhor desempenho quando as PII possuem a cauda de histidina e a proteína-alvo (neste caso, a NAGK) está na forma nativa.

É importante destacar que a proteína utilizada por Araújo (2018) apresentava uma mutação próxima ao sítio catalítico, por isso uma nova construção (NAGK-his) foi realizada e

utilizada no presente trabalho.

Considerando que a presença da cauda de histidina interferiu nos ensaios de *pull-down* com PII realizados, foi testada a remoção da cauda 6×His por tratamento com a protease TEV (gentilmente cedida pelo doutorando Marcelo Conzentino). A análise por SDS-PAGE confirmou a clivagem eficiente, evidenciada pela redução no tamanho aparente da proteína no gel, compatível com a porção removida pela TEV (Fig. 14C). A amostra foi carregada novamente em coluna HisTrap e, uma vez que não possuía mais a cauda de de 6x his, foi eluída durante a lavagem, sendo separada da TEV (TEVhis) e da porção clivada.

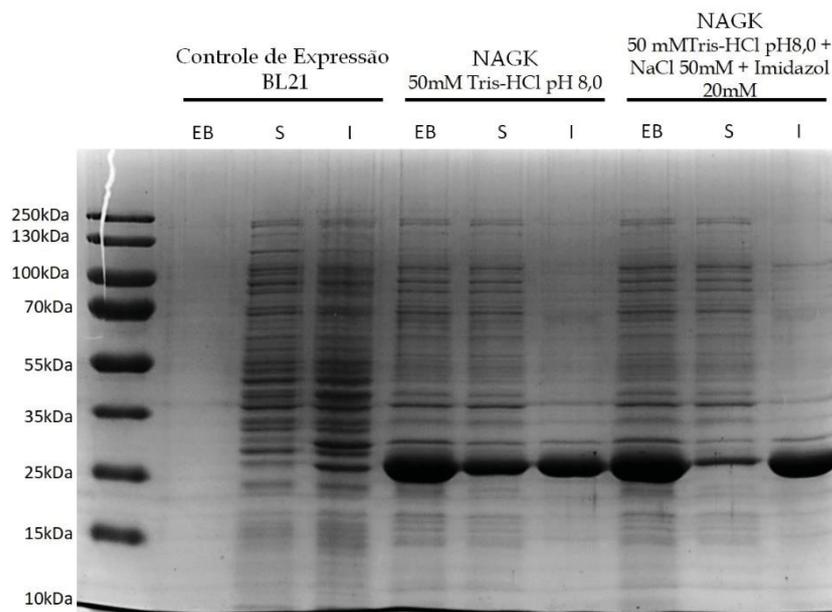
Essa amostra de NAGK foi utilizada para um novo ensaio de *pull-down*, dessa vez com PII com cauda de histidina. Infelizmente o ensaio não funcionou pois depois do tratamento o rendimento de NAGK foi muito baixo, inviabilizando repetições.

Outras purificações de NAGK-his foram realizadas, mas sempre apresentando problemas semelhantes.

### **6.3 Capacitação internacional e preparação da proteína NAGK para estudos estruturais.**

No período de 15/08/2024 a 13/11/2024, o projeto foi desenvolvido no laboratório do Professor Khaled Selim, na Universidade de Freiburg, na Alemanha, durante período de capacitação aprovado pelo Capes Print e complementado pelo projeto Serrapilheira. O objetivo proposto no projeto era obter treinamento sobre as melhores condições para a realização da técnica Cryogenic Electron Microscopy (Cryo EM) para as proteínas alvo de PII em estudo.

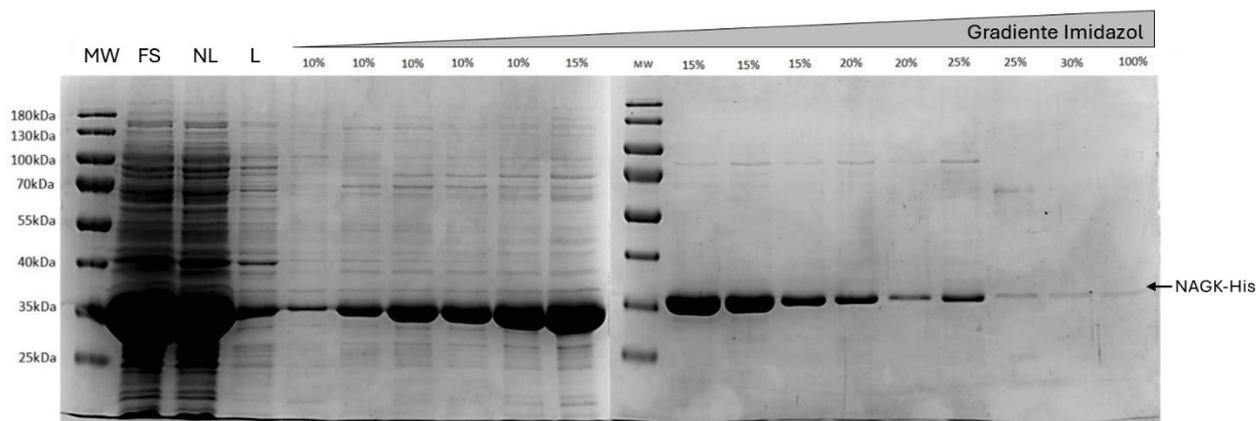
Para a análise de NAGK no laboratório do professor Selim, primeiramente realizamos a transformação de *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) com o plasmídeo pARSS\_NAGKTEV, portando o gene da NAGK de *A. brasilense*, e expressamos 1L da proteína com a cultura em DO<sub>600</sub> de 0,4, com adição de 0,25 mM de IPTG e incubação a 20°C com agitação por 20 horas. Foi utilizado um total de 600mL dessa cultura e posteriormente, a cultura foi centrifugada e as células decantadas foram coletadas. Para um primeiro teste de solubilidade, uma pequena fração das células foram ressuspenas em tampão 50mM Tris HCl pH 8,0 e em tampão 50mM Tris HCl pH 8,0 + NaCl 50 mM + Imidazol 20 mM e lisadas por sonicação e as frações solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE (figura 15).



**Figura 15 – Teste de expressão da proteína NAGK, lisada em dois diferentes tampões.** Perfil eletroforético SDS – PAGE 12%. EB = extrato bruto; S = solúvel; I= insolúvel. Fonte: A autora.

Como já havíamos percebido em testes anteriores, NAGK-his apresenta-se mais solúvel quando o tampão não contém adição de sal (NAGK 50mM Tris HCl pH 8,0), sugerindo que a presença do sal nessa etapa interfere na solubilidade da proteína. Desse modo, o restante das células expressando NAGK foram ressuspensas em 20 mL de tampão Tris HCl pH 8,0.

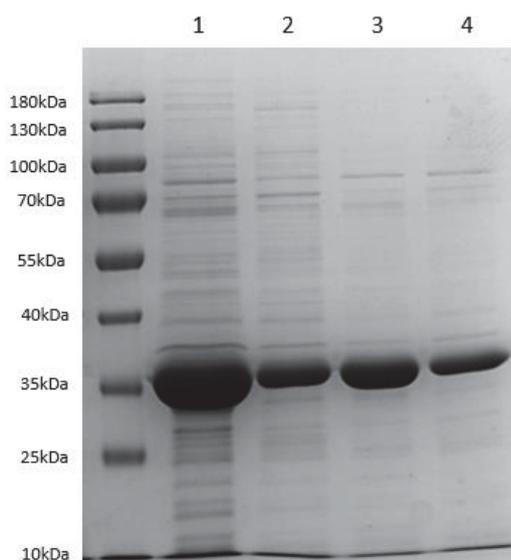
Vinte mililitros do extrato bruto foram lisados e a fração solúvel foi carregada em coluna HisTrap de 1 mL (Cytiva – HisTrap®) previamente equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 7,5 (tampão A). A purificação foi realizada manualmente com a coluna acoplada a uma seringa. Foram coletadas as frações não ligadas (*flow thought*) e lavagem (com tampão A) e a eluição foi realizada com concentrações crescentes de imidazol em tampão Tris HCl 50mM pH 7,5 (0,1 a 1 M de imidazol) e conforme a figura 16, podemos observar que a eluição da proteína iniciou em 10% (100mM) até cerca de 25% (250mM). Foram coletadas frações de 1 mL, que foram analisadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (figura 16) e posteriormente submetidas à diálise.



**Figura 16 – Purificação de NAGK-his.** Perfil eletroforético SDS - PAGE 12% da purificação de NAGK por cromatografia de afinidade (*chelating*) em coluna HisTrap. MW- Marcador de peso molecular; FS – Fração Solúvel; NL – Fração Não ligada (*Flow through*); L – lavagem. Fonte: A autora.

As frações purificadas foram coletadas, reunidas em quatro alíquotas (alíquota 1: frações 5 de 10% e 1 de 15% - gel painel esquerdo fig. 3; alíquota 2: frações 1 a 4 em 10%, gel painel esquerdo fig. 3; alíquota 3: frações 2 a 4 em 15%, gel painel direito fig. 3; alíquota 4: fração 5 de 15%, e frações de 20% e 25%). As amostras foram dialisadas em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5, em membrana de 3,5 kDa por 20 h.

A quantificação foi realizada por NanoDrop 2000® através do coeficiente de extinção molar de abNAGK,  $12950 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  e o peso molecular de 32kDa obtidos através do endereço da *web ProtParam* de acordo com a sequência específica de aminoácidos da enzima. A quantificação obtida foi de 8,45mg/mL para alíquota 1; 2,3mg/mL para alíquota 2; 1,52mg/mL para alíquota 3 e 0,7mg/mL para alíquota 4 (figura 17).



**Figura 17 – Perfil eletroforético das alíquotas obtidas após purificação e diálise de NAGK.** Quinze microlitros de NAGK foram aplicados em gel SDS PAGE 12,5%. Após a corrida o gel foi corado com corante comassie blue. Fonte: A autora.

As proteínas PII nativas, GlnB e GlnZ, também foram purificadas e reunidas em alíquotas. Com o coeficiente de extinção molar das proteínas AbGlnB-wt e AbGlnZ-wt (2980 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup> e 4470 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>, respectivamente) e peso molecular de 12,371 e 12,271kDa respectivamente por monômero, a quantificação obtida por Nanodrop foi de 0,661mg/mL para alíquota 1 de GlnB e 0,711mg/mL para a alíquota 2. Para GlnZ, a quantificação foi de 0,161mg/mL para alíquota 1 e 0,875mg/mL para alíquota 2.

PII com cauda de histidina foram quantificadas pelo método dosagem de proteínas Bradford e foi quantificado para a AbGlnB-his foi 0,076mg/mL e para a AbGlnZ-his de 0,400mg/mL.

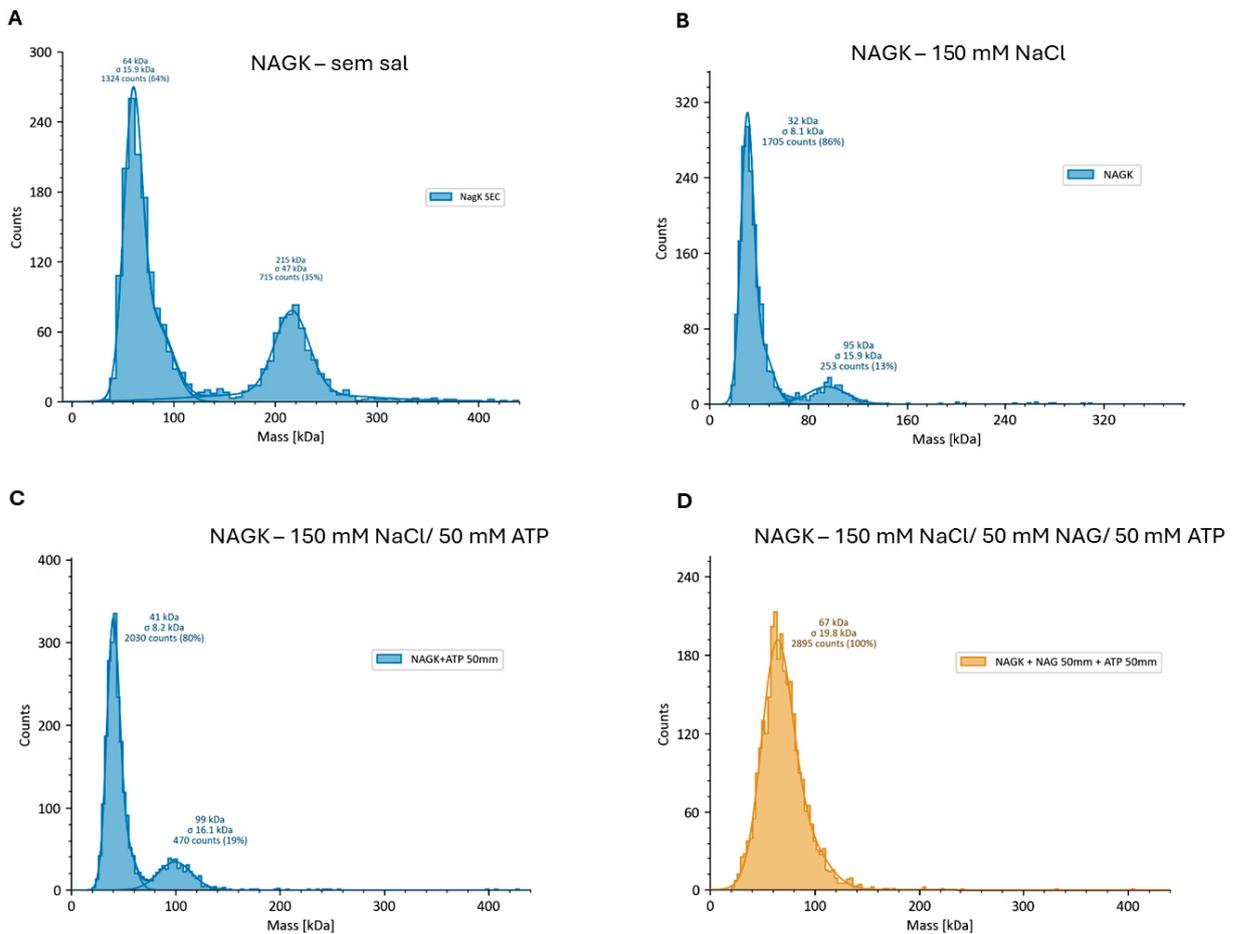
#### **6.4 Capacitação - Fotometria de massas NAGK-his**

Após a diálise, a alíquota mais concentrada da proteína NAGK com cauda de histidina (NAGKhis alíquota 1) foi submetida a uma tentativa de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), que infelizmente não obteve sucesso devido a um erro técnico. No entanto, a amostra foi recuperada após passar pela coluna e, em seguida, utilizada nos ensaios de fotometria de massas para avaliação do estado oligomérico da enzima (Figura 18A).

Antes da análise, o equipamento de fotometria de massas monomolecular (Refeyn) foi calibrado com albumina bovina (BSA), utilizando o mesmo tampão empregado nos ensaios (Tris HCl 50 mM, pH 7,5), de forma a garantir maior acurácia na determinação das massas moleculares das espécies proteicas analisadas.

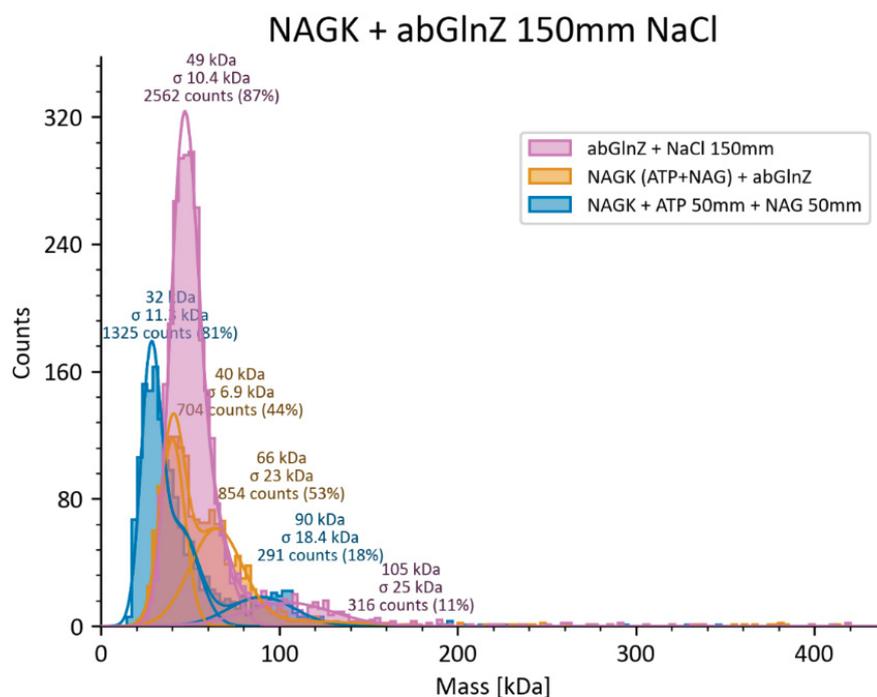
A amostra recuperada foi diluída a 15 ng/mL e analisada em tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, sem adição de sal. Conforme demonstrado na Figura 18A, a maior parte da proteína (64%) foi detectada na forma dimérica, com massa aproximada de 64 kDa (monômero de 32 kDa). Uma fração minoritária (35%) apresentou massa estimada de  $215 \pm 47$  kDa, compatível com a formação hexamérica da enzima (massa teórica de 192 kDa). Esse foi o único ensaio em que se observou a presença de hexâmeros de NAGKhis.

Ensaio realizados com outras alíquotas da mesma purificação em tampões contendo NaCl, condição necessária para investigar a interação com a proteína PII, não apresentaram sinais da forma hexamérica, mesmo na presença dos substratos NAG e ATP (Figuras 18B, 18C e 18D).



**Figura 18 – Ensaio de fotometria de massas Refeyrn para a NAGKhis.** A) NAGK-his depois de ser recuperada da coluna SEC, diluída a 15ng/mL em tampão Tris – HCl 50mM pH 8,0 sem nenhuma adição de sal. B) NAGKhis purificada diluída a 15ng/mL em tampão Tris – HCl 50mM + 150mM NaCl C) NAGKhis purificada e diluída a 15ng/mL no tampão Tris – HCl + 150mM NaCl + ATP 50mM para induzir hexamerização, D) NAGKhis purificada e diluída a 15ng/mL no tampão Tris – HCl + 150mM NaCl + ATP 50mM + NAG 50mM para induzir hexamerização. Fonte: A autora.

Baseado no que se tem de informação sobre o complexo NAGK-P11, para ter a interação com P11, é necessário que NAGK esteja na conformação hexamérica (Llácer *et al.*, 2007; Llácer *et al.*, 2008; Ramon-Maiques *et al.*, 2008), a qual conforme discutido anteriormente, só foi possível observar em um ensaio conforme observado na figura 18A. Mesmo não tendo sido detectada a presença do hexâmero, foram realizados ensaios na presença de GlnZ, a fim de verificarmos se a formação do complexo ocorreria (Fig.19). Porém nenhuma interação foi detectada pela técnica de fotometria de massas, assim como observado nos ensaios de *pull-down* realizados anteriormente. Outras combinações de ensaios foram realizadas, mas nenhuma delas resultou em formação de complexo, reforçando a interferência da cauda de histidina da região N-terminal de NAGK.



**Figura 19 – Ensaio de fotometria de massas para a observação de interação de AbNAGK-his com AbGlnZ em tampão 50mM Tris – HCl pH 7,5 + 150mM NaCl.** Em rosa a abGlnZ na forma de trímero com 49 kDa  $\pm$ 10,4 (monômero 12,3 kDa) confirmando o trímero. Em azul, a NAGK-his no mesmo tampão com adição de ATP mais NAG para a indução de hexamerização não observada, se apresentando em monômero (32 kDa) e trímero (90 kDa). Em laranja o ensaio de interação que não foi observada para as proteínas. AbGlnZ aparece como trímero no pico de 40kDa e AbNAGK-his aparece como dímero no pico de 66 kDa  $\pm$  23. Fonte: A autora.

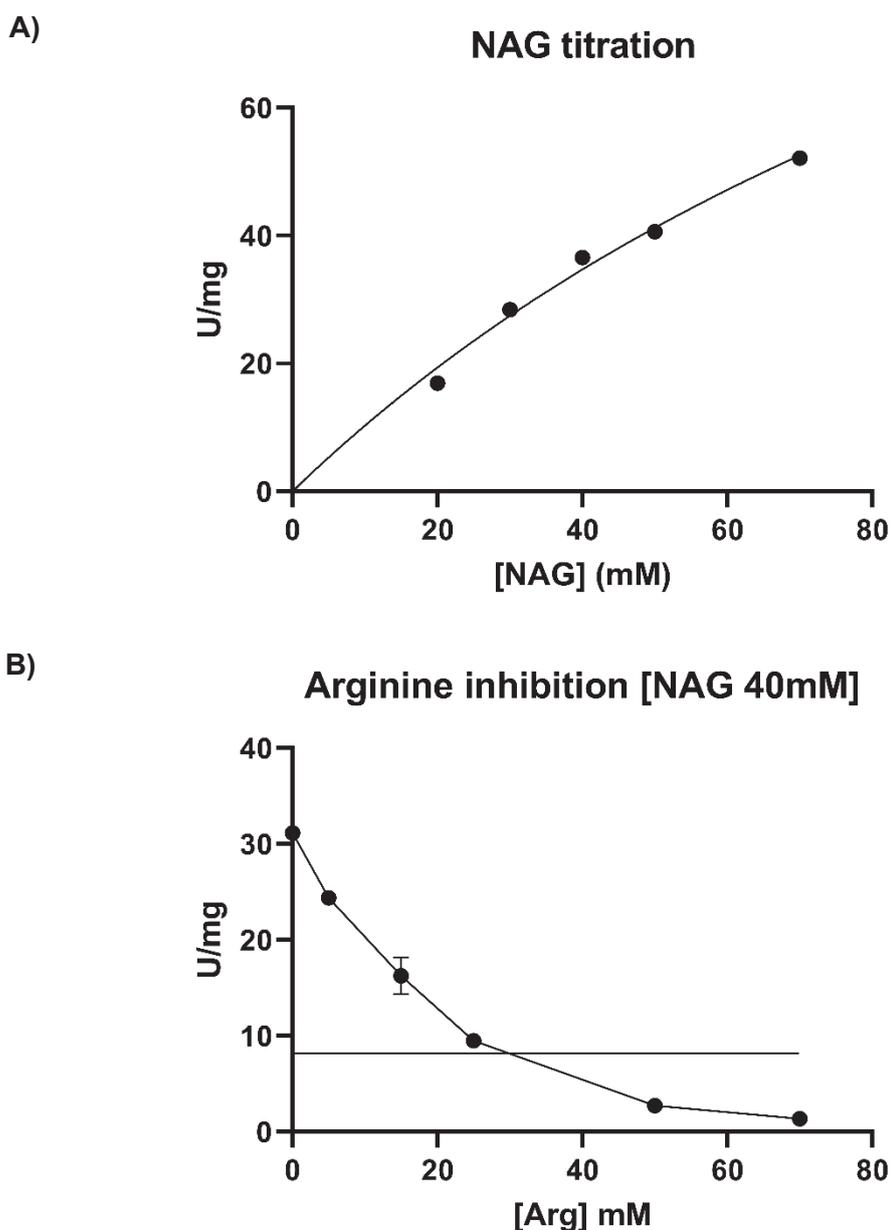
Com o resultado estrutural da fotometria de massas, principalmente no que diz respeito a oligomerização da enzima, podemos concluir que mesmo com a adição dos substratos, a enzima com cauda de histidina não apresentou hexamerização, permanecendo maioritariamente na forma dimérica e sem interação com GlnZ.

### 6.5 Capacitação - Cinética enzimática NAGK-his

Para avaliar a atividade da enzima NAGK-his majoritariamente dimérica, foram realizados testes de cinética enzimática, primeiramente com a titulação do N-Acetilglutamato (NAG), para estimativa de  $K_m$ . Para a determinação das concentrações de NAG utilizadas no ensaio, foi utilizado como base o artigo de Selim e colaboradores (2019) para a NAGK de *S. elongatus* (SeNAGK) com ajustes para a AbNAGK, com concentrações de 20 a 80 mM de NAG (figura 20A). Os resultados cinéticos foram analisados com o programa *Graph Pad Prism 9*, tendo sido obtidos os valores de  $K_m$  de 152.4 mM e  $V_{max}$  de 166.9 U/mg. Esses resultados quando comparados aos dados de  $K_m$  em estudos como o de Selim e colaboradores (2019) para a SeNAGK ( $K_m$  de 5,1mM e  $V_{max}$  de 12.1 U/mg), para a SeNAGK de Beez e colaboradores (2009) ( $K_m$  de 7,4  $\pm$  1,4 mM) e para *A. thaliana* (AtNAGK 0,87  $\pm$  0,11 mM),

indicam valores muito acima dos esperados, podendo indicar uma atividade ineficiente de NAGK. Além disso, as concentrações testadas não permitiram a saturação real da enzima, mas optamos por não aumentar a concentração de NAG, uma vez os dados obtidos estariam muito distantes de dados obtidos *in vitro* para a saturação da enzima conforme descrito por Beez e colaboradores (2009) e Selim e colaboradores (2019), que 40mM já é uma concentração saturante para a enzima.

Um outro parâmetro comum a NAGK hexaméricas é a inibição por altas concentrações de arginina conforme descrito por Beez e colaboradores (2009) a  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50% da atividade) foi observada para SeNAGK sem a interferência de PII como 0,02 mM (20  $\mu$ M) e quando presente com PII no ensaio, a concentração sobe para 0,19 mM, enquanto para a AtNAGK mantém o dado de 0,02 mM (20  $\mu$ M) sem PII e com PII, de 0,17 mM. No ensaio de titulação da arginina, foi utilizada uma concentração fixa de NAG a 40mM (saturante em condições normais) e variando a concentração de arginina de 5, 10, 15, 20 e 25mM (Selim *et al.*, 2019). Embora a curva indique um perfil de diminuição de atividade na presença de arginina (Fig. 20B), a inibição ocorre em concentrações de arginina muito acima da concentração observada por ensaios de Beez *et al* (2009) e Selim *et al* (2019), acima de 40mM. Como os dados obtidos por fotometria de massas indicaram que a enzima estava maioritariamente dimérica (Fig. 18), é esperado que NAGK não apresente regulação por arginina, como é observado para NAGK de *E. coli*. Esse resultado corrobora com a forma dimérica observada pelo ensaio de fotometria de massas, reforçando que quando dimérica, a concentração de arginina precisa estar muito mais alta do que as concentrações fisiológicas para a enzima ser inibida, portanto, não é necessário a intervenção de PII para liberar o sítio alostérico da enzima para ela continuar a catálise, enquanto a enzima hexamérica necessita da intervenção da PII para modificar o sítio alostérico conforme mostrado no trabalho de Watzer e colaboradores (2015).



**Figura 20 – Atividade enzimática da AbNAGK-his.** A) Titulação da concentração de NAG para determinar  $K_m$  e  $V_{max}$ . B) Titulação da inibição por arginina da AbNAGKhis. Fonte: A autora.

### 6.6 Subclonagem de *argB* em pET29a para retirada da cauda de histidina da AbNAGK

Conforme discutido até aqui, NAGK-his não apresentou resultados compatíveis aos dados obtidos anteriormente por Araújo (2018) e Santos. Uma das hipóteses levantadas é de que a cauda N-terminal de histidina possa interferir no enovelamento da proteína, afetando tanto sua conformação hexamérica quanto sua atividade enzimática, que se mostrou reduzida em comparação com enzimas homólogas de outras espécies.

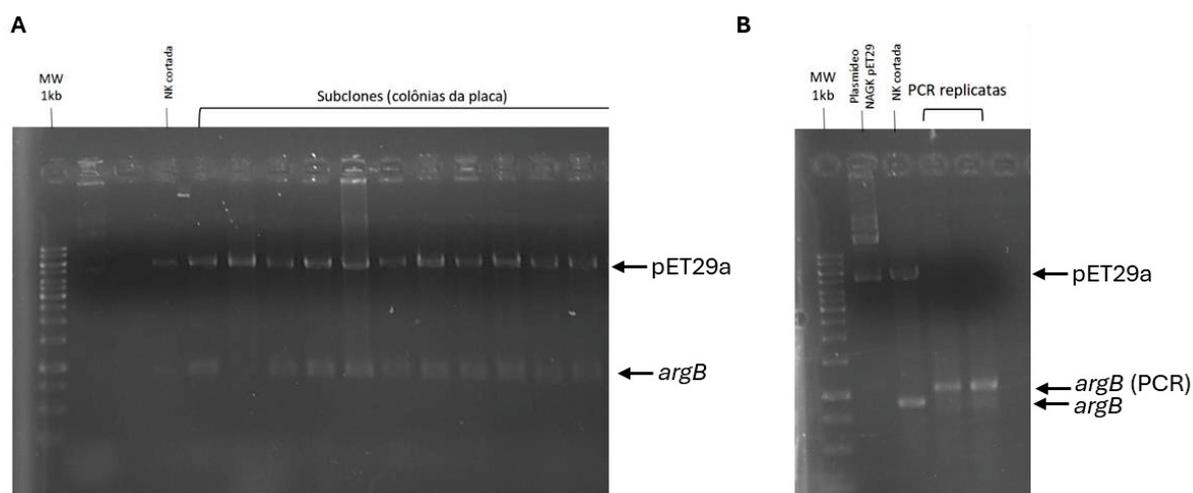
Diante desses resultados, decidiu-se subclonar o gene *argB* do plasmídeo pTEV5 para o vetor pET29a, que permite a expressão da proteína sem a cauda de histidina, com o objetivo

de avaliar os mesmos parâmetros estruturais e enzimáticos e verificar se a proteína em sua forma nativa apresentaria comportamento semelhante ou diferenças significativas.

O plasmídeo pARSS\_NAGKTEV foi inicialmente purificado por minipreparação (ver Métodos) e submetido a digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I em tampão TANGO 10X, com digestão dupla, utilizando ambas as enzimas na mesma reação, em um volume final de 50 µL. O produto foi então submetido à reação de ligação com DNA ligase em tampão específico, sendo incubado a 16 °C por 16 horas, conforme descrito em Métodos.

A primeira tentativa de ligação, no entanto, não foi bem-sucedida, mas obtivemos sucesso na segunda tentativa, utilizando maior quantidade de DNA na digestão. Após a ligação, o plasmídeo pJNL1NAGK foi transformado em células competentes de *E. coli* TOP10, cultivadas em meio LA suplementado com canamicina (Km<sup>r</sup>), antibiótico correspondente ao marcador de resistência do vetor.

As colônias obtidas foram submetidas a minipreparações plasmidiais, seguidas de digestão enzimática dupla com *Bam*HI e *Nde*I. A análise em gel de agarose 1% confirmou a presença do inserto (Fig. 21A), indicando que os subclones obtidos foram bem-sucedidos e continham o DNA de interesse.



**Figura 21 – Subclones obtidos após ligação e novo corte com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I em gel de agarose 1%. Confirmação dos clones por A. restrição e B. PCR. Fonte: A autora.**

Após a obtenção dos subclones, foi realizada uma nova minipreparação a partir daqueles que apresentaram padrão de bandas compatível com a AbNAGK digerida. Em seguida, o fragmento foi submetido à amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) para confirmar se a região inserida correspondia ao inserto correto, utilizando *primers* específicos da região promotora T7 (*forward* e *reverse*), tendo como controle pARSS\_NAGKTEV previamente digerido para comparação do tamanho esperado no gel de agarose. O resultado mostrou bandas com tamanho coerente ao previsto, confirmando que a restrição funcionou

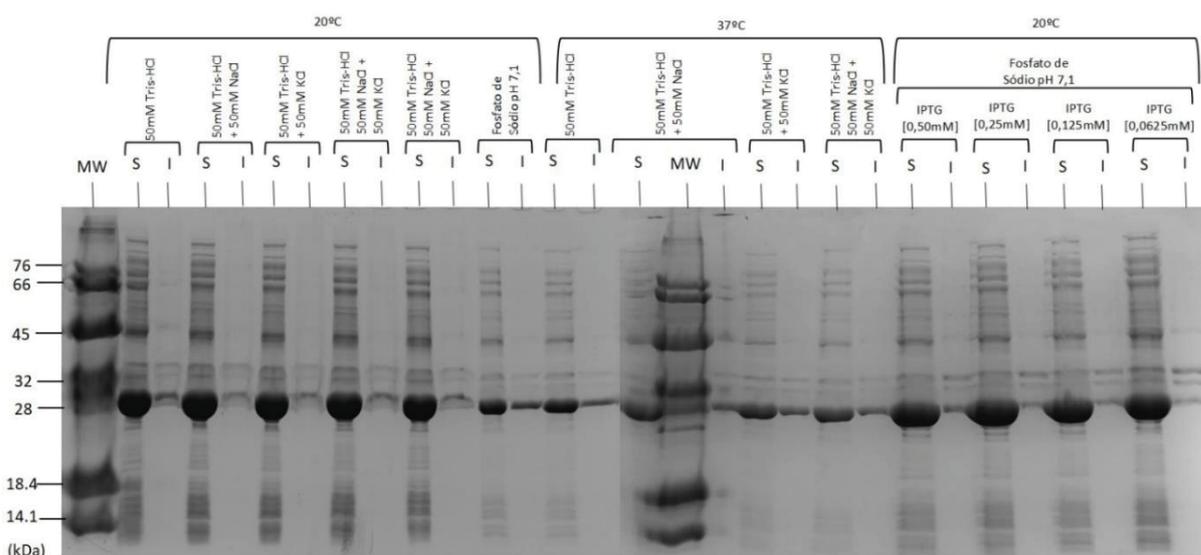
corretamente e que os clones continham a região codificadora da AbNAGK.

Com a confirmação de que a subclonagem funcionou e portanto, possível a expressão da enzima AbNAGK sem a cauda de histidina, os próximos passos foram de novamente encontrar as melhores condições de expressão e tampão que a enzima sem a cauda de histidina se apresentasse de maneira satisfatória

### **6.7 Expressão e purificação da AbNAGK nativa**

Como mencionado anteriormente, novos testes foram realizados para determinar as melhores condições de expressão e purificação da AbNAGK nativa. O primeiro teste realizado foi o de concentração ideal de IPTG, temperatura e tempo de expressão para avaliar por SDS-PAGE qual seriam as condições da qual a enzima teria maior rendimento na fase solúvel e conforme podemos observar na figura 22, a melhor condição foi semelhante NAGK-his, com melhores rendimentos quando expressos a 20°C por 16 horas *overnight*. Quanto a concentração de IPTG, as faixas testadas não mostraram diferença no rendimento de enzimas obtidas na fase solúvel, portanto não se faz necessário um ajuste fino dessa concentração, uma vez que não apresenta diferença significativa nesse quesito e portanto foi escolhida a concentração de 0,25mM.

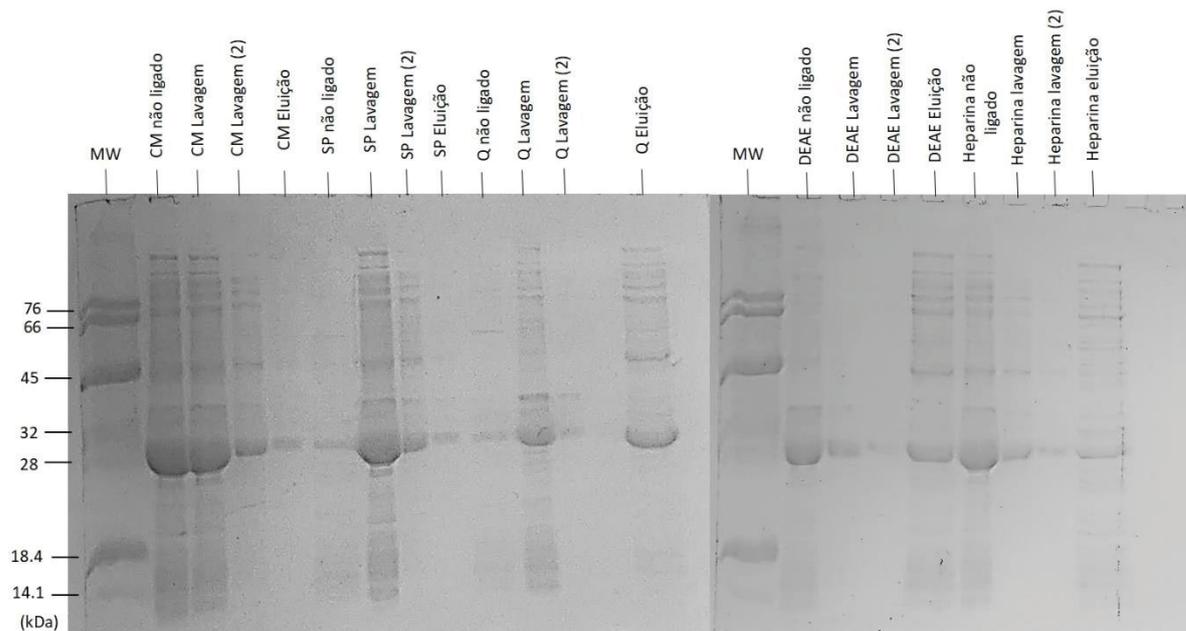
Quanto ao tampão utilizado, o único que apresentou diferença no rendimento foi o fosfato de sódio pH 7,1, enquanto os tampões à base de Tris-HCl pH 7,5, com variações no tipo e concentração de sal (NaCl ou KCl), não mostraram diferenças significativas no rendimento (Figura 22). No entanto, para avaliar melhor o comportamento da enzima, são necessários testes adicionais. A escolha de testar ambos os sais justifica-se pela necessidade de compatibilidade com os ensaios posteriores envolvendo a proteína PII, cuja purificação utiliza KCl. Para fins de purificação e ensaios apenas com a AbNAGK, foi escolhido o tampão Tris-HCl pH 7,5 com 50mM de NaCl, segunda condição demonstrada no painel à esquerda à 20°C.



**Figura 22 – Testes de tampões e condições de expressão AbNAGK nativa.** Siglas: S: solúvel e I: insolúvel. Fonte: A autora.

Com as condições de expressão estabelecidas, a etapa seguinte foi determinar a resina ideal para a purificação da AbNAGK-wt. De acordo com a análise na ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) da ExpASy, o ponto isoelétrico (pI) da enzima é 5,73, valor no qual a proteína apresenta carga líquida neutra. Considerando o tampão utilizado nos ensaios de purificação (50 mM Tris HCl, pH 7,5 + 50mM NaCl), a enzima se encontra em pH acima do seu pI e, portanto, apresenta carga líquida negativa (aproximadamente -3,2). Nessas condições, a AbNAGK-wt é capaz de interagir com resinas carregadas positivamente, como a DEAE (dietilaminoetil) ou a Q Sepharose (*Quaternary ammonium*), utilizadas em cromatografia de troca aniônica.

Com base nas informações sobre o ponto isoelétrico da AbNAGK-wt, foram realizados testes de interação com diferentes resinas cromatográficas, com o objetivo de avaliar a afinidade da enzima por matrizes com distintas propriedades de carga. Foram testadas tanto resinas carregadas positivamente, como DEAE e Q Sepharose, quanto resinas carregadas negativamente, como CM (carboximetil) e SP (sulfopropil), utilizadas em cromatografia de troca catiônica. Adicionalmente, também foi avaliada a interação com a resina de Heparina, que, embora não seja uma resina de troca iônica convencional, possui alta densidade de carga negativa e é classificada como uma resina de afinidade, frequentemente empregada na purificação de proteínas que interagem com ácidos nucleicos ou cofatores. Os resultados desses testes estão representados na Figura 23.



**Figura 23 – Testes de resinas carregadas negativamente e positivamente para purificação da AbNAGK-wt.** Fonte: A autora.

Conforme o esperado, a enzima AbNAGK-wt, em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 + 50mM NaCl, não apresentou interação significativa com as resinas CM e SP, ambas carregadas negativamente. A maior parte da proteína foi detectada nas frações de não ligado e lavagem, indicando baixa afinidade nessas condições. Em todos os ensaios, a eluição foi realizada com tampão B (50 mM Tris HCl, pH 7,5, contendo 1 M NaCl).

Por outro lado, o perfil de interação foi distinto com as resinas carregadas positivamente, Q Sepharose e DEAE. Em ambos os casos, a enzima apresentou interação satisfatória, com predominância da proteína nas frações eluídas e presença reduzida nas frações de lavagem e não ligado, como demonstrado na Figura 23.

Diante desses resultados, e com base na análise das bandas obtidas por SDS-PAGE, observou-se que a resina Q Sepharose apresentou maior rendimento em comparação à DEAE. Assim, a Q Sepharose foi escolhida como matriz para a etapa de purificação da enzima.

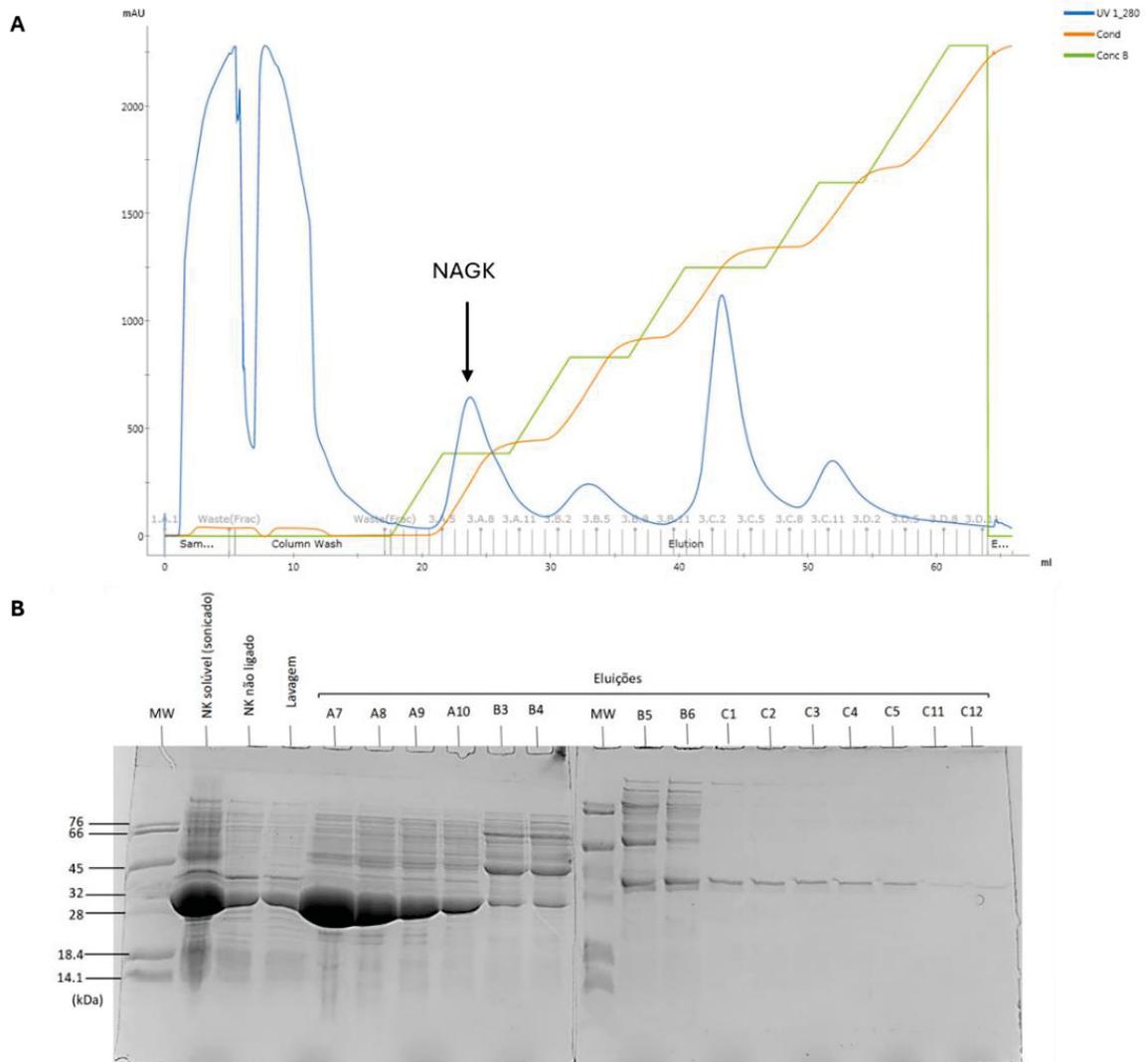
A purificação da AbNAGK-wt foi realizada por cromatografia líquida de alta performance sob pressão moderada (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*), utilizando o sistema ÄKTA Pure (Cytiva). Para o procedimento, foram acopladas ao equipamento duas colunas Q Sepharose de 1 mL cada. O tampão A (50 mM Tris HCl, pH 7,5, com 50 mM NaCl) foi utilizado para o equilíbrio da coluna, enquanto o tampão B (50 mM Tris HCl, pH 7,5, com 1 M NaCl) foi empregado para a eluição da enzima e de outras proteínas eventualmente presentes. A eluição foi realizada com o aumento gradual da proporção de tampão B, sendo

as frações coletadas em uma placa de 96 poços com volume de 1 mL por poço, conforme descrito na metodologia.

A proporção entre os tampões A e B foi ajustada no sistema com base na detecção de absorvância em UV, de modo a manter constante a concentração de tampão B enquanto era detectada a presença de proteínas. As frações referentes aos picos detectados no cromatograma foram aplicadas em gel SDS-PAGE, e foi possível observar que AbNAGK-wt foi eluída de forma satisfatória com aproximadamente 16,5% de tampão B, o que corresponde a uma concentração de cerca de 165 mM de NaCl (Fig. 24). No entanto, embora essas frações apresentem maior rendimento, sua pureza é inferior à das amostras eluídas com cerca de 700 mM de NaCl (70% de tampão B), que, apesar do menor rendimento, demonstraram maior pureza proteica.

As frações foram então agrupadas em dois lotes, de acordo com a concentração da enzima (mais concentradas e menos concentradas) (alíquota 1, referente aos poços A7, A8, A9 e A10 (Fig. 24B) e alíquota 2, C1, C2, C3, C4 e C5), e submetidas à diálise por 20 horas em membrana apropriada, com quatro trocas de 250 mL de tampão A, seguidas de uma troca adicional com 1 L do mesmo tampão realizada *overnight*. Após a diálise, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o método de Bradford (1976).

A alíquota 1 apresentou concentração de 2,810mg/mL e a alíquota 2, 1,587mg/mL e esses dados foram usados para os ensaios posteriores.



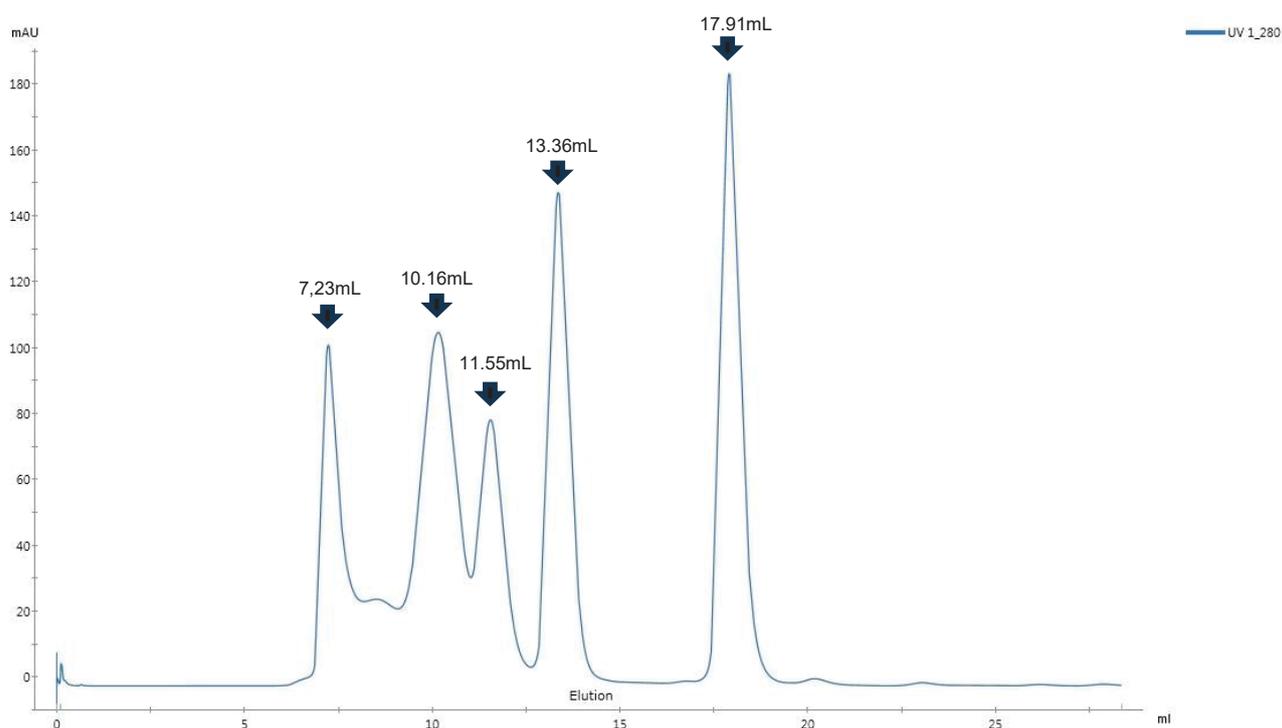
**Figura 24 – Purificação de AbNAGK-wt no sistema de purificação ÄKTA Pure (Cytiva). A.** perfil cromatográfico. Em azul o índice de UV obtido na presença da proteína quando eluída (280nm), em laranja a condutividade do tampão e em verde a concentração do tampão B. **B.** Perfil Eletroforético em SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie Blue. Fonte: A autora.

## 6.8. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

Após a quantificação da AbNAGK-wt, a fração mais concentrada (alíquota 1) foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) com o objetivo inicial de avaliar o estado oligomérico da enzima. A análise buscou verificar se a proteína recombinante purificada, sem a cauda de histidina, se apresenta na forma hexamérica como descrito na literatura ou como dimérica da mesma forma que a com cauda de histidina. O ensaio foi realizado utilizando a coluna Superose 12 10/300 GL, previamente equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, contendo 50 mM de NaCl.

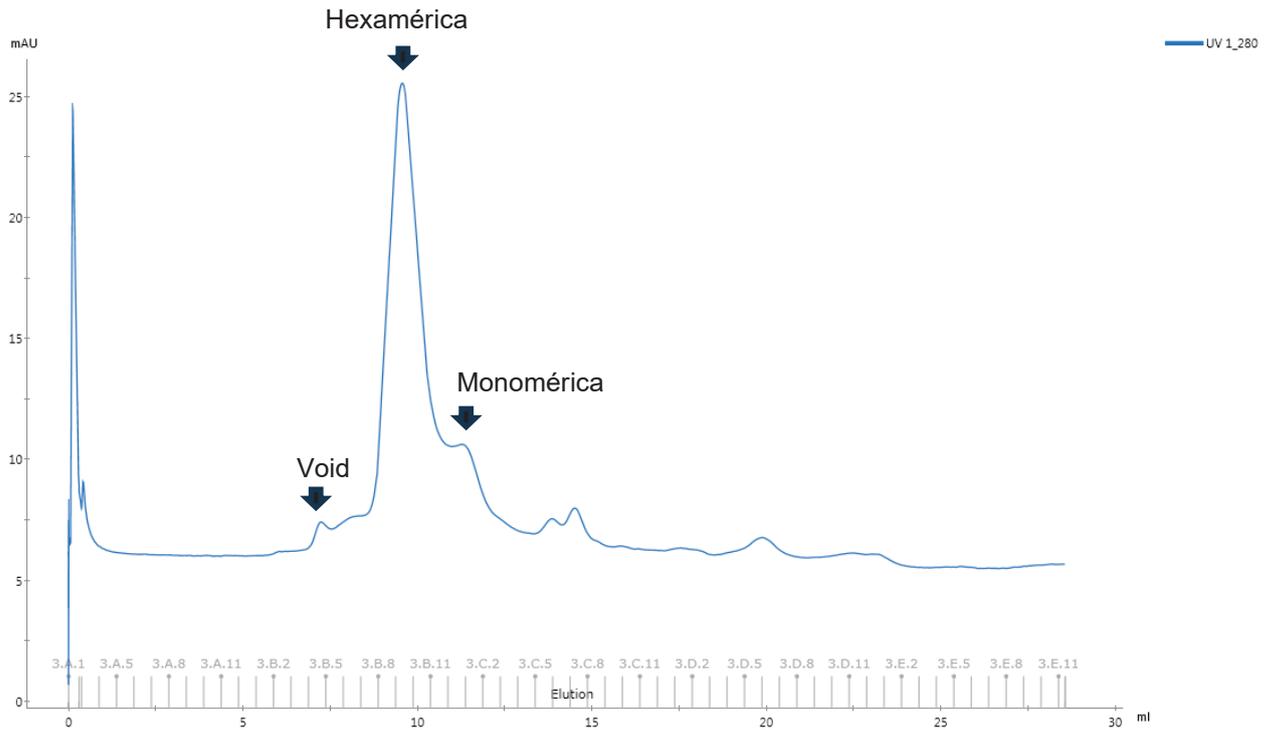
Para estimar o peso molecular aparente das espécies eluídas, a coluna foi previamente calibrada com o padrão comercial de proteínas de massa molecular conhecida

(Fig. 25) (Bio-Rad, Cat. #1511901), que inclui tireoglobulina eluída em 7,23mL (670 kDa),  $\gamma$ -globulina bovina eluída em 10,16mL (158 kDa), ovalbumina eluída em 11,55mL (44 kDa), mioglobina eluída em 13,36 mL (17 kDa) e vitamina B12 eluída em 17,91mL (1,35 kDa). O volume de eluição de cada proteína foi registrado e correlacionado ao logaritmo de sua massa molecular, gerando a curva de calibração utilizada como referência. A partir dessa correlação, foi possível estimar o peso molecular aparente da AbNAGK-wt e inferir seu estado de oligomerização em solução.



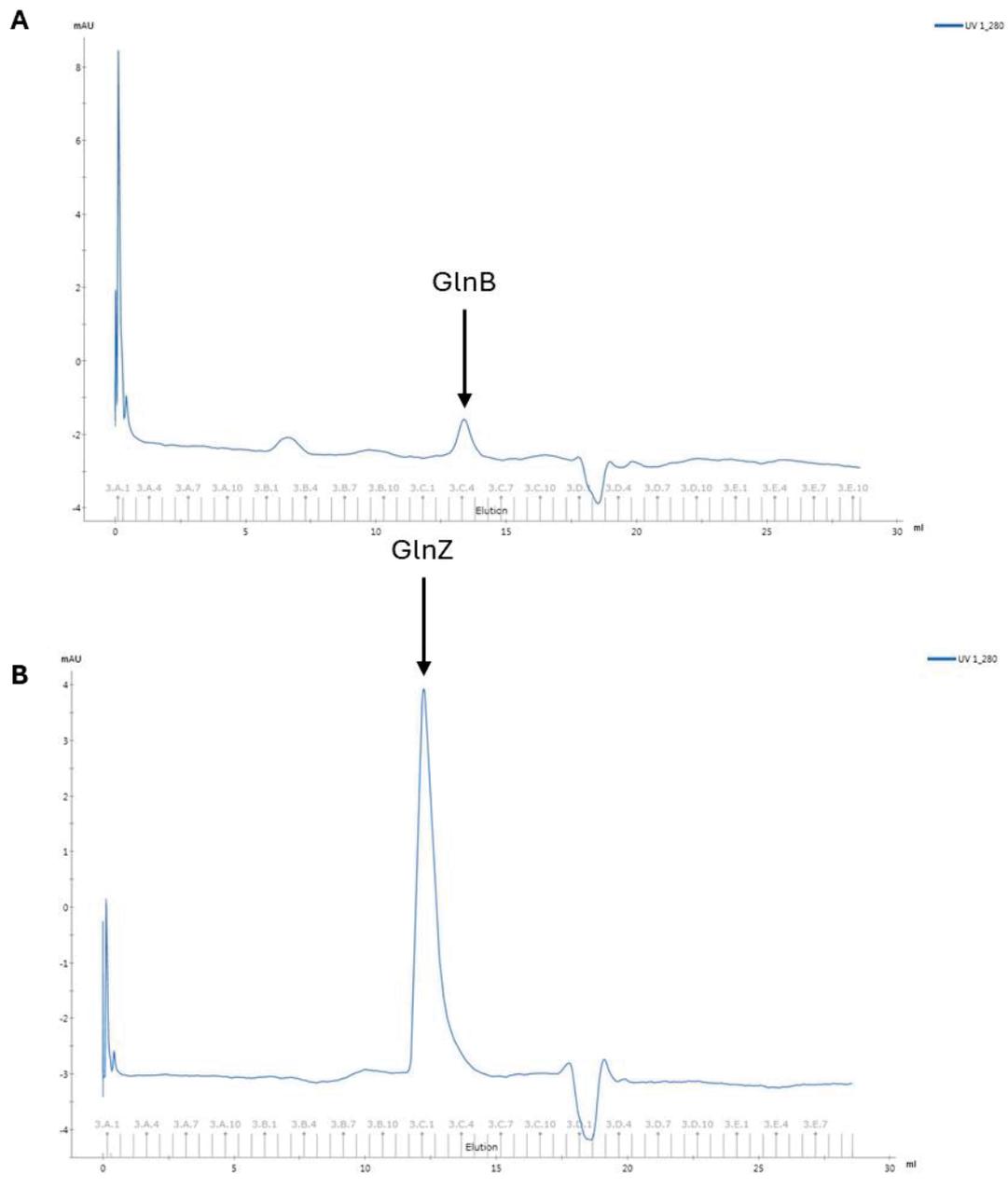
**Figura 25 – Calibração de pesos moleculares (MW) da coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) Superose 12 10/300 GL com calibrante Bio-Rad.** Fonte: A autora.

Após a calibração da coluna, 200  $\mu$ L da AbNAGK-wt purificada (primeira alíquota) foram injetados no sistema. A análise do perfil de eluição revelou que a enzima se encontra predominantemente na forma hexamérica (Figura 26), uma vez que o pico principal foi observado em 9,646 mL, correspondendo a uma massa molecular estimada de aproximadamente 172,86 kDa. Considerando que o monômero da AbNAGK possui massa de 28,8 kDa, esse valor é compatível com a associação de seis subunidades ( $28,8 \times 6 = 172,8$  kDa). Portanto, os dados obtidos indicam que a enzima está presente principalmente na forma hexamérica, como esperado com base no comportamento observado para os calibrantes utilizados.



**Figura 26 – Forma oligomérica da AbNAGK-wt em análise de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) em coluna Superose 12 10/300 GL. Fonte: A autora.**

Após verificar o estado de oligomerização da AbNAGK-wt foi verificado o estado de oligomerização das proteínas PII, AbGlnB e AbGlnZ também em suas formas nativas, para observar se estavam adotando a conformação típica de trímero da proteína para então posteriormente tentar o ensaio de interação e foi obtido o resultado de trímero para ambas as proteínas conforme figura 14 e 15 com eluição em 13,39 mL para a AbGlnB e 12,23 mL para a AbGlnZ (Fig. 27).

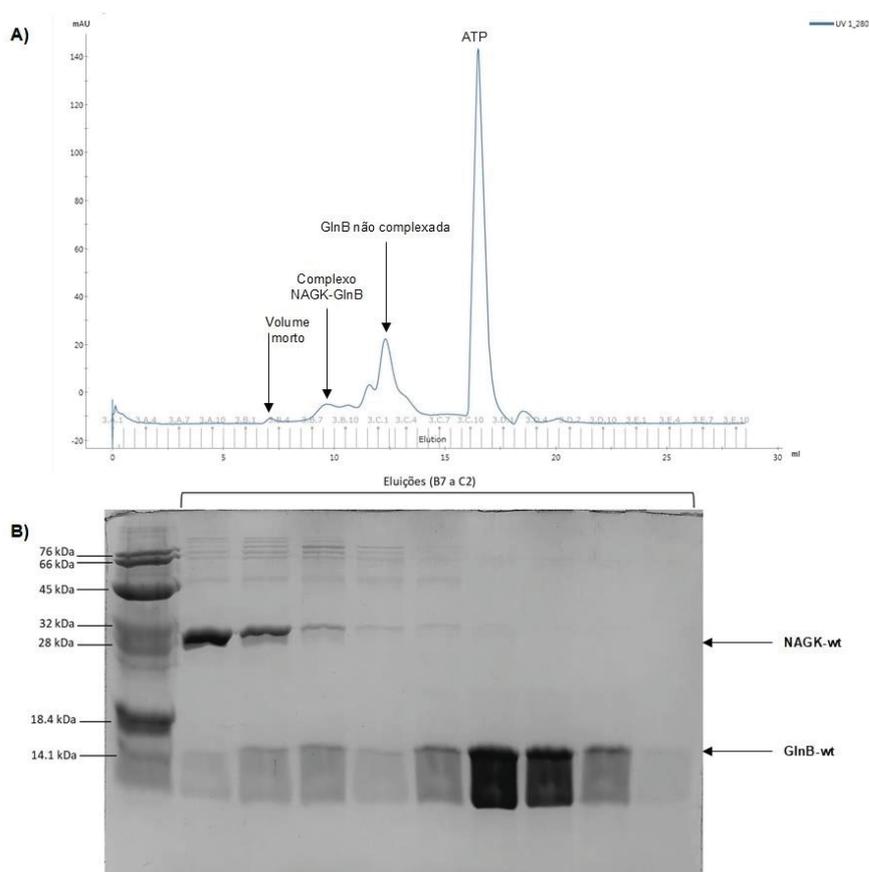


**Figura 27 – Perfil de eluição de PII em cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) em coluna Superose 12 10/300 GL. A. GlnB; B. GlnZ** Fonte: A autora.

Com as proteínas na forma oligomérica correta para a interação, a primeira condição testada para a interação foi com o tampão A (50mM Tris -HCl pH 8,0 + 50mM NaCl) na presença de ATP, pois foi a condição na qual foi observada interação com AbGlnZ por Gerhardt e colaboradores (2020). As duas proteínas PII, GlnB e GlnZ, foram testadas, para isso, usamos a estequiometria de 1:1 (massa:massa) de PII:NAGK, em tampão contendo 10 mM de ATP. As proteínas foram encubadas em em gelo (4°C) por 60 minutos. Após esse tempo o conteúdo do tubo com as respectivas proteínas foram injetadas no equipamento previamente calibrado com tampão A mais ATP e como resultado, conseguimos detectar

complexo apenas entre AbNAGK-wt e AbGlnB (figura 28).

O complexo entre ambas as proteínas eluiu entre 9,69mL com peso calculado de 212 kDa (Fig. 28A), sendo confirmado por SDS-PAGE (Fig. 28B), com a presença das duas proteínas no volume de 9,69mL, que é distinto do obtido para as proteínas isoladamente. Para o complexo entre AbNAGK-wt e AbGlnZ na presença de ATP, mesmo com ajustes no protocolo como aumentar ou diminuir o tempo de interação de ambas as proteínas no gelo, não foi observado a formação de complexo no gráfico ou por SDS -PAGE de todos os ensaios que foram testados.



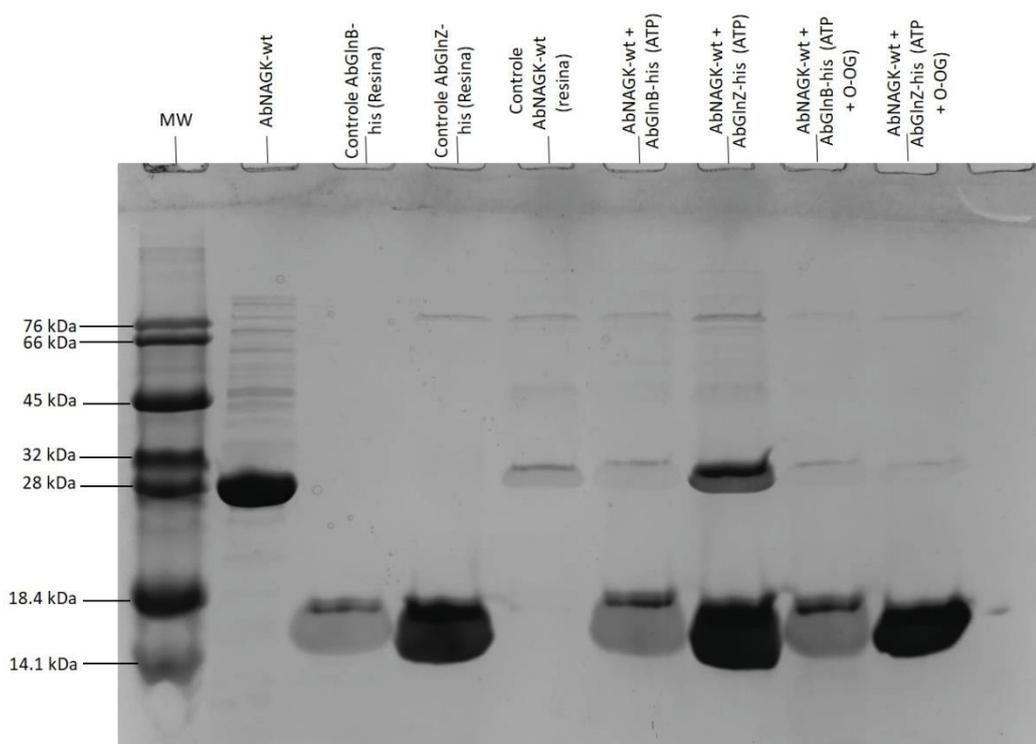
**Figura 28 – Complexo entre AbNAGK-wt e AbGlnB-wt em cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) em coluna Superose 12 10/300 GL. A. Perfil cromatográfico da eluição em SEC. B. Perfil eletroforético das frações B7 a C2 em SDS-PAGE 14%. Fonte: A autora.**

### 6.9 Ensaio de interação proteína – proteína NAGK-P11 (*pull-down assay*)

Para o ensaio de interação, foram utilizadas as proteínas AbNAGK-wt, GlnB-his e GlnZ-his, purificadas conforme os métodos descritos previamente, com ajustes conforme necessário. A reação foi realizada com 30  $\mu$ g de AbNAGK-wt e 20  $\mu$ g de cada proteína P11, na presença de tampão contendo ATP e ATP + 2-OG como controle de interação. A análise por

SDS-PAGE (Figura 29) revelou que a AbNAGK-wt, no controle negativo (sem proteína PII), apresentou uma leve interação inespecífica com a resina magnética mesmo adicionando Imidazol (20mM) no tampão. No entanto, observou-se interação evidente entre a AbNAGK-wt e a AbGlnZ-his na presença de ATP (figura 29), enquanto no controle, com a presença de 2-OG no tampão, o complexo foi desestabilizado conforme esperado. Interessantemente, não foi detectada interação com a AbGlnB-his nas condições testadas.

Uma possível explicação para a ausência de interação entre AbNAGK-wt e GlnB-his é a baixa concentração proteica obtida após a purificação da proteína AbGlnB-his, que pode ser observada no gel na figura 29. Mesmo compensando teoricamente a concentração aumentando o volume total da reação, no gel podemos observar que a banda correspondente a AbGlnB-his em comparação a AbGlnZ-his é diferente e significamente menor e pode ter afetado a interação tanto pela quantidade da proteína PII quanto pelo aumento do volume da reação.



**Figura 29 – SDS-PAGE 12% Ensaio proteína-proteína NAGK-PII *pulldown*.** Fonte: A autora.

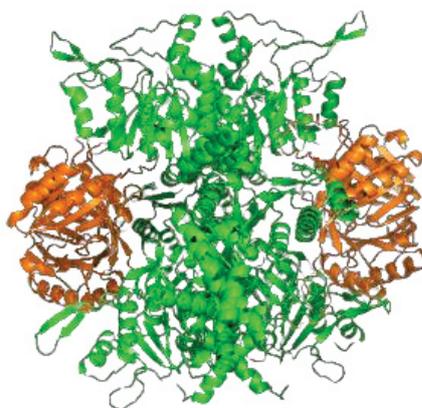
Portanto, é necessário repetir os ensaios, tanto da SEC para ambas as proteínas quanto do *pulldown*, mantendo as mesmas condições e utilizando uma nova purificação de AbGlnB-his. O objetivo é verificar se a interação ocorre com maior concentração da proteína na presença dos efetores, conforme esperado e observado para a AbGlnB com a AbNAGK. Os dados obtidos até aqui estão de acordo com os dados experimentais de Beez et al. (2009) e Selim et al. (2019), que demonstraram que a *SeNAGK* e a *AtNAGK* interagiram com o PII

na presença de ATP e  $Mg^{2+}$ , formando um complexo estável.

Também será necessário realizar novos ensaios, tanto na ausência de efector quanto na presença do efector ADP. O complexo SeNAGK-PII, por exemplo, é desestabilizado pela presença de ADP, enquanto para a AtNAGK a interação não é significativamente afetada, o que representa uma grande diferença entre as espécies. Além disso, 2-OG inibe a formação do complexo entre PII-NAGK em *S. elongatus* enquanto em *A. thaliana*, reverte parcialmente a ligação do complexo PII-NAGK (Beez et al., 2009; Selim et al., 2019). Para a AbNAGK, ainda são necessários novos testes.

### 6.10 Predição do complexo NAGK-GlnZ

Visto que conseguimos confirmar a hexamerização de NAGK, bem como a formação do complexo com GlnZ, utilizamos o servidor AlphaFold3 para prever a estrutura tridimensional do complexo NAGK-GlnZ (Fig. 30). Assim como para as estruturas já conhecidas de NAGK-PII, a estequiometria com melhor ajuste foi de 2 trímeros de PII para 1 hexâmero de NAGK, com participação dos *loops* T de GlnZ na estabilização do complexo.

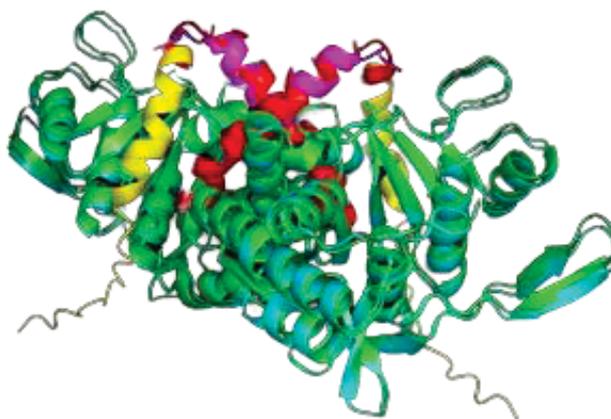


**Figura 30 – Predição do complexo e razão estequiométrica de AbNAGK com AbGlnZ.** Em verde a AbNAGK hexamérica e em laranja, dois trímeros de PII. Imagem predita no AlphaFold Server 3 e editada no programa Pymol. Fonte: A autora.

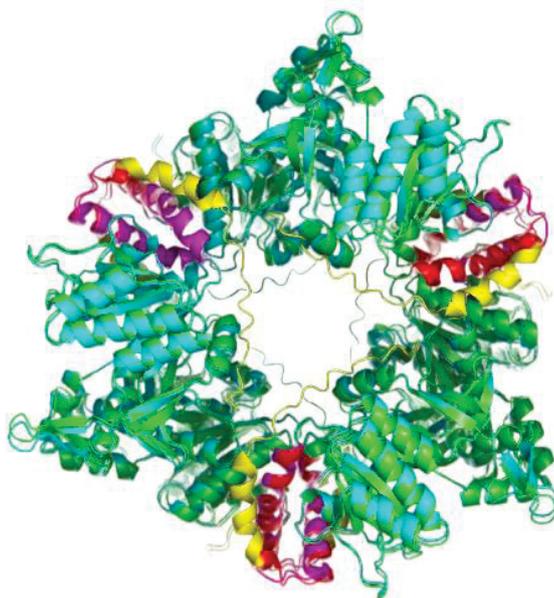
Para a formação do complexo, conforme mencionado anteriormente, é necessária a oligomerização hexamérica da enzima NAGK (Llácer *et al.*, 2007; Llácer *et al.*, 2008), bem como a presença de efetores como ATP e  $Mg^{2+}$ , que estabilizam a estrutura (Beez *et al.*, 2009). Essa mesma dependência foi observada neste trabalho para o complexo AbNAGK-GlnZ. Tentativas anteriores de formar o complexo utilizando a variante NAGK-his não tiveram êxito, provavelmente devido à presença da cauda de histidina (6xHis) na porção N-terminal da enzima (Fig 31). Essa região forma uma hélice, denominada hélice N-terminal, que se entrelaça entre subunidades (Fig 32), promovendo a formação do anel hexamérico essencial

tanto para a inibição por arginina quanto para a interação com a proteína sinalizadora PII (Ramon-Maiques *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2015).

Quando a cauda 6xHis é adicionada à extremidade N-terminal, ela atua como uma barreira física, dificultando o entrelaçamento dessa hélice com as demais subunidades e, conseqüentemente, a montagem do hexâmero. Como evidenciado nas predições estruturais (Fig. 31 e Fig. 32), a hélice N-terminal da NAGK-wt está representada em rosa, enquanto na NAGK-his aparece em vermelho, com a cauda 6xHis em amarelo, posicionada na superfície externa do monômero e comprometendo o encaixe entre subunidades. Esse impedimento afeta diretamente a formação do sítio alostérico sensível à arginina e a interface interna do anel hexamérico, onde ocorre o reconhecimento pela proteína PII por meio de seu T-loop, que se ancora na interface entre os domínios N-terminal e C-terminal de cada subunidade, sendo o domínio N-terminal fundamental para essa ligação (Llácer *et al.*, 2007; Mizuno *et al.*, 2007).



**Figura 31 – Comparação das estruturas do monômero de AbNAGK-wt (rosa e ciano) e AbNAGK-his (amarelo, vermelho e verde).** Em verde NAGK-wt; ciano – NAGK-his; Rosa – Hélice N-terminal NAGK-wt; vermelho – Hélice N-terminal NAGK-his; Amarelo – Cauda 6x His NAGK-his. Imagem predita no AlphaFold Server 3 e editada no programa Pymol. Fonte: A autora.



**Figura 32 – Comparação das estruturas preditas de NAGK-his e NAGK-wt.** Em verde NAGK-wt; ciano – NAGK-his; Rosa – Helice N-terminal NAGK-wt; vermelho – Helice N-terminal NAGK-his; Amarelo – Cauda 6x His NAGK-his. Imagem predita no AlphaFold Server 3 e editada no programa Pymol. Fonte: A autora.

A conformação hexamérica da NAGK parece ser a mais prevalente no contexto evolutivo, em comparação à estrutura dimérica insensível à arginina, como evidenciado no alinhamento apresentado na Figura 33. A forma dimérica, observada em *E. coli* (Ramon-Maiques *et al.*, 2002) e *K. pneumoniae* (Fig. 33B), não apresenta sensibilidade à arginina, característica também confirmada neste trabalho e, portanto, não requer a intervenção da proteína PII por regulação alostérica para permitir a catálise.

A



B



**Figura 33 – Alinhamento da sequência de NAGK de diferentes organismos. A.** Alinhamento de NAGK em organismos que apresentam NAGK hexamérica. **B.** Alinhamento da região N-terminal de NAGK dimérica (*E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e hexamérica. Alinhamento Clustal W, programa BioEdit. Fonte: A autora.

## 7. CONCLUSÕES

- AbNAGK é afetada pela cauda de histidina N terminal, região necessária para a oligomerização hexamérica da enzima;
- AbNAGK com a cauda de histidina demonstra a mesma oligomerização da NAGK de *E. coli*, sem sensibilidade à arginina e dimérica.
- A cauda de histidina na região N terminal da enzima também atrapalha a atividade enzimática de NAGK, fazendo a enzima mais lenta do que deveria ser, porém precisa de mais testes para a confirmação do *Km* real da enzima sem a cauda de histidina;
- AbNAGK é hexamérica e apresenta interação com as proteínas PII AbGlnB e AbGlnZ na presença de ATP.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALLEN, Mary Mennes. Inclusions: cyanophycin. In: COLLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (ed.). **Methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, 1988. v. 167, p. 207-213. ISBN 9780121820688.
- ANDERSON, G.; CHAKRAVARTY, S. The Genus *Pseudomonas*. **Practical Handbook of Microbiology**. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1201/B17871-24>.
- ARAÚJO, L. M.; HUERGO, L. F.; INVITTI, A. L.; GIMENES, C. I.; BONATTO, A. C.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Different Responses of the GlnB and GlnZ Proteins upon in Vitro Uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD Protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n.4, p. 289–294, 2008.
- ARCONDÉGUY, T; JACK, R; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.80-105.2001>.
- ARSENE, F., P. A. KAMINSKI, C. ELMERICH. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 179, p. 339–343, 1999.
- ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28288–28293, 1994.
- ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v.29(2), p.431- 447, 1998.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can. J Microbiol.**, v.50, p.521-577, 2004.
- BEEZ, S.; FOKINA, O.; HERRMANN, C.; FORCHHAMMER, K. N-Acetyl-L-Glutamate Kinase (NAGK) from Oxygenic Phototrophs: PII Signal Transduction across Domains of Life Reveals Novel Insights in NAGK Control. **Journal of Molecular Biology**, v. 389, n. 4, p. 748–758, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p. 248-254, 1976.
- BURILLO, S.; LUQUE, I.; FUENTES, I.; CONTRERAS, A. Interactions between the

NitrogenSignal Transduction Protein PII and N-Acetyl Glutamate Kinase in Organisms That Perform Oxygenic Photosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3346–3354, 2004.

CALDOVIC, Ljubica; TUCHMAN, Mendel. N-acetylglutamate and its changing role through evolution. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 2, p. 279-290, 2003. doi: 10.1042/BJ20030002.

CHAN, M.; KIM, J.; REES, D. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 792–794, 1993.

CHELLAMUTHU, V.-R.; ERMILOVA, E.; LAPINA, T.; LÜDDECKE, J.; MINAEVA, E.; HERRMANN, C.; HARTMANN, M. D.; FORCHHAMMER, K. A Widespread Glutamine-Sensing Mechanism in the Plant Kingdom. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1188–1199, 2014.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory Links between Carbon and Nitrogen Metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 167–172, 2006.

CONROY MJ, DURAND A, LUPO D, LI XD, BULLOUGH PA, WINKLER FK; MERRICK M. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **P Natl Acad Sci USA** v. 104, p.1213–1218, 2007.

CUNIN, R.; GLANSDORFF, N.; PIÉRARD, A.; STALON, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 3, p. 314–352, 1986.

DAGERT, M.; EHRLICH, S. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. **Gene**, v. 6, n. 1, p. 23-28, 1979. DOI: 10.1016/0378-1119(79)90082-9.

DANYAL, K.; SHAW, S.; PAGE, T. R.; DUVAL, S.; HORITANI, M.; MARTS, A. R.; LUKOYANOV, D.; DEAN, D. R.; RAUGEI, S.; HOFFMAN, B. M.; SEEFELDT, L. C.; ANTONY, E. Negative cooperativity in the nitrogenase Fe protein electron delivery cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 40, p. E5783–E5791, 2016.

DIXON, R. The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel twocomponent regulatory system controlling nitrogenase synthesis in *ammaproteobacteria*. **Arch. Microbiol.** v. 169, p. 371–380, 1998.

DE ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in

*Azospirillum brasilense*. **Molecular & General Genetics**, v. 224, n. 3, p. 421-430, dez. 1990. DOI: 10.1007/BF00262437.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 449-463, jul. 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00938.x.

DE ZAMAROCZY, MIKLOS et al. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143-4149, 1996.

DIXON, R. The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel twocomponent regulatory system controlling nitrogenase synthesis in ammaproteobacteria. **Arch. Microbiol.** v. 169, p. 371–380, 1998.

DIXON, R.; KAHN, D.; INNES, J. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **NatureReviews**. v. 2, n.8, 2004.

DRUMMOND, M., P. WHITTY, AND J. WOOTTON. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO J.**v. 5, p. 441–447, 1986.

DRUMMOND, M. H.; CONTRERAS, A.; MITCHENALL, L. A. The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 29-37, jan. 1990. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb02012.x. PMID: 2181238.

DÖBEREINER, Johanna; PEDROSA, Fábio O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers, 1987.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.J. (Eds). Intl. Symp. **Nitrogen Fixation**. Pullman: USA: Washington Univ. Press, v.2, p.518-538, 1976.

DURAND, A.; MERRICK, M. 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**, v. 281, n. 40, p. 29558–29567, 2006.

**EXPASY**. ProtParam tool. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>.

FERIA BOURRELLIER, A. B.; VALOT, B.; GUILLOT, A.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; VIDAL, J.; HODGES, M. Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 502-507, 2010.

FERNÁNDEZ-MURGA, M. L.; GIL-ORTIZ, F.; LLÁCER, J. L.; RUBIO, V. Arginine biosynthesis in *Thermotoga maritima*: Characterization of the arginine-sensitive N-acetyl-L-glutamate kinase. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6142–6149, 2004.

FERNÁNDEZ-MURGA, M. L.; RUBIO, V. Basis of Arginine Sensitivity of Microbial N-Acetyl-L-Glutamate Kinases: Mutagenesis and Protein Engineering Study with the *Pseudomonas Aeruginosa* and *Escherichia coli* Enzymes. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 3018–3025, 2008.

FORCADA-NADAL, A.; LLÁCER, J.; CONTRERAS, A.; MARCO-MARÍN, C.; RUBIO, V. The PII-NAGK-PipX-NtcA regulatory axis of cyanobacteria: a tale of changing partners, allosteric effectors and non-covalent interactions. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00091>.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. Functional analysis of the phosphoprotein PII (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2033-2040, 1995. DOI: 10.1128/jb.177.8.2033-2040.1995.

FORCHHAMMER, K.; HEDLER, A. Phosphoprotein PII from Cyanobacteria. **FEBS Journal**, v. 244, p. 869-875, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00869.x>

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

FORCHHAMMER, K.; LÜDDECKE, J. Sensory properties of the PII signalling protein family. **FEBS Journal**, v. 283, p. 425-437, 2016.

FORCHHAMMER, Karl; SELIM, Khaled A.; HUERGO, Luciano F. New views on PII signaling: from nitrogen sensing to global metabolic control. **Trends in Microbiology**, 2022. doi: 10.1016/j.tim.2021.12.014.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU V.R.; ZETH, K.; FORCHHAMMER, K. A novel signal transduction protein PII variant from *Synechococcus elongates* PCC 7942 indicates a two-step process for NAGK-PII complex formation. **J. Mol. Biol.** v. 399, p. 410-421, 2010.

GERHARDT, E. 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*, v. 5, n. 6, e00817-20, 3 nov. 2020. DOI: 10.1128/mSystems.00817-20.

GERHARDT, E. C. M.; ARAÚJO, L. M.; RIBEIRO, R. R.; CHUBATSU, L. S.; SCARDUELLI, M.; RODRIGUES, T. E.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E.M.; HUERGO, L. F. Influence of the ADP/ATP Ratio, 2-Oxoglutarate and Divalent Ions on *Azospirillum brasilense* PII Protein Signalling. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. pt 6, p. 1656–1663, 2012.

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

GEORGIADIS, M. M.; KOMIYA, H.; CHAKRABARTI, P.; WOO, D.; KORNUC, J. J.; REES, D. C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1653–1659, 18 set. 1992. doi: 10.1126/science.1529353. PMID: 1529353.

HAKENBECK, R.; STOCK, J. B. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. **Meth. Enzymol.**, v. 273, p. 281-300, 1996.

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

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041–4062, 2014.

HUANG, Y.; LI, C.; ZHANG, H.; LIANG, S.; HAN, S.; LIN, Y.; YANG, X.; ZHENG, S. Monomeric *Corynebacterium glutamicum* N-acetyl glutamate kinase maintains sensitivity to L-arginine but has a lower intrinsic catalytic activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1789-1798, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7065-4>.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Effects of over-Expression of the Regulatory Enzymes DraT and DraG on the Ammonium-Dependent Post-Translational Regulation of Nitrogenase Reductase in *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 183, n. 3, p. 209–217, 2005.

HUERGO, L.; SOUZA, E.; ARAUJO, M.; PEDROSA, F.; CHUBATSU, L.; STEFFENS, M.; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG.

**Molecular Microbiology**, v. 59, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04944.x>.

HUERGO, L.; MERRICK, M.; PEDROSA, F.; CHUBATSU, L.; ARAÚJO, L.; SOUZA, E. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 66, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06016.x>.

HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; MULLER-SANTOS, M.; CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; MERRICK, M.; SOUZA, E. M. PII Signal Transduction Proteins: Pivotal Players in Post-Translational Control of Nitrogenase Activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p.176–190, 2012.

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

HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Meta-bolite. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 79, n. 4, p. 419–435, 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**., v. 331, p.413–425, 2010.

INABA, J.; HUERGO, L. F.; BONATTO, A. C.; CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; STEFFENS, M. B.; KLASSEN, G.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. *Azospirillum brasilense* PII proteins GlnB and GlnZ do not form heterotrimers and GlnB shows a unique trimeric uridylylation pattern. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, n. 5-6, p. 388-394, 2008. DOI: [10.1016/j.ejsobi.2008.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.006).

JAVID-MAJD, F.; BLANCHARD, J. Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase. **Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1285-1293, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/BI992177F>.

JIANG P.; NINFA A.J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. **Biochemistry** 46: 12979– 12996, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 1906-1911, 1999.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; HIRAKAWA, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000. Disponível em: <https://www.kegg.jp/>.

KAMBEROV E.S.; ATKINSON M.R.; NINFA A.J. The *Escherichia coli* PII signal

transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J Biol Chem** 270: 17797–17807, 1995.

KIM, J.; REES, D. C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1677-1682, 1992.

**KEGG PATHWAY Database.** Arginine biosynthesis – *Azospirillum brasilense*. Disponível em: <https://www.kegg.jp/pathway/abr00220>.

**KEGG PATHWAY Database.** Arginine biosynthesis – *Escherichia coli K-12 MG1655*. Disponível em: <https://www.kegg.jp/pathway/eco00220>.

**KEGG PATHWAY Database.** Arginine biosynthesis – *Synechocystis sp. PCC 6803*. Disponível em: <https://www.kegg.jp/pathway/syc00220>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LLÁCER, L. CONTRERAS A, FORCHHAMMER K, MARCO-MARÍN C, GIL-ORTIZ F, MALDONADO R, FITA I, RUBIO V. The crystal structure of the complex of P II and acetylglutamate kinase reveals how P II controls the storage of nitrogen as arginine. **PNAS**, v.104, n.45, 2007.

LLÁCER, J. L.; FITA, I.; RUBIO, V. Arginine and nitrogen storage. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 6, p. 673–681, 2008.

LANCASTER, K. M.; ROEMELT, M.; ETTENHUBER, P.; HU, Y.; RIBBE, M. W.; NEESE, F.; BERGMANN, U.; DEBEER, S. X-ray emission spectroscopy evidences a central carbon in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 974–977, 2011.

LAPINA, T.; SELIM, K. A.; FORCHHAMMER, K.; ERMILOVA, E. The PII signaling protein from red algae represents an evolutionary link between cyanobacterial and Chloroplastida PII proteins. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

LEE, J.; SPERANDIO, V.; FRANTZ, D. E.; LONGGOOD, J.; CAMILLI, A.; PHILLIPS, M. A.; MICHAEL, A. J. An Alternative Polyamine Biosynthetic Pathway Is Widespread in Bacteria and Essential for Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9899–9907, 2009.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 349-377, 2007.

LENIS, Y.; ELMETWALLY, M.; ESTRADA, J.; BAZER, F. Physiological importance of polyamines. **Zygot**, v. 25, p. 244-255, 2017. DOI: 10.1017/S0967199417000120.

MAHESWARAN, M.; URBANKE, C.; FORCHHAMMER, K. Complex Formation and

- Catalytic Activation by the PII Signaling Protein of N-Acetyl-L-Glutamate Kinase from *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p.55202–55210, 2004.
- MAHESWARAN, M.; ZIEGLER, K.; LOCKAU, W.; HAGEMANN, M.; FORCHHAMMER, K. PII-Regulated Arginine Synthesis Controls Accumulation of Cyanophycin in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2730–2734, 2006.
- MAAS, W. K.; NOVELLI, G. D.; LIPMANN, F. Acetylation of glutamic acid by extracts of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 39, n. 10, p. 1004-1008, 1953. DOI: 10.1073/pnas.39.10.1004.
- MCCLORY, J. et al. Phosphorylation mechanism of N-acetyl-L-glutamate kinase, a QM/MM study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 13, p. 2844-2852, 2019. DOI: 10.1021/acs.jpccb.9b00547.
- MCFARLAND, N.; MCCARTER, L.; ARTZ, S.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons *ntrB* and *ntrC*: identification of their protein products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 4, p. 2135-2139, 1981. <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.4.2135>.
- MERRICK, M. J., EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.
- MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria, p. 835–876. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), **Biological nitrogen fixation**. Chapman and Hall, New York, 1992.
- MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2015.
- MIZUNO, Y.; MOORHEAD, G.; NG, K. Structural basis for the regulation of N-acetylglutamate kinase by PII in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 35733-35740, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M707127200>.
- MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SCARDUELLI, M.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E.M.; SEEFELDT, L. C. The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.
- MOURE, V. R.; SIÖBERG, C. L. B.; VALDAMERI, G.; NJI, E.; OLIVEIRA, M. A. S.; GERDARDT, E. C. M.; PEDROSA, F. O.; MITCHELL, D. A.; SEEFELDT, L. C.; HUERGO, L. F.; HÖGBOM, M.; NORDLUND, S.; SOUZA, E. M. The ammonium transporter AmtB and the PII signal transduction protein GlnZ are required to inhibit

DraG in *Azospirillum brasilense*. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 14, p. 2876-2888, 2019. DOI: 10.1111/febs.14745.

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

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII Signal Transduction Proteins: Sensors of Alpha-Ketoglutarate That Regulate Nitrogen Metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 168– 173, 2005.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v.63, p.366-370, 1997.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.900-915, 1983.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência hoje**, v.6, p.12- 13, 1987.

PERRIG, D.; BOIERO, M.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; RUIZ, O.; CASSÁN, F.; LUNA, M. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, p. 1143-1150, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-0909-9.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge. Cambridge Univ.Press. 252p, 1982.

RAMÓN-MAIQUES, S.; MARINA, A.; GIL-ORTIZ, F.; FITA, I.; RUBIO, V. Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. **Structure**, v. 10, n. 3, p. 329-342, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00721-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00721-9).

RADCHENKO, M. V., THORNTON, L., MERRICK, M.. Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarato. **J Biol Chem.**, v. 285, p.31037-45, 2010.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 155–176, 2003. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.57.030502.090820>.

ROCCO, C. J.; DENNISON, K. L.; KLENCHIN, V. A.; RAYMENT, I.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Construction and use of new cloning vectors for the rapid isolation of recombinant proteins from *Escherichia coli*. **Plasmid**, v. 59, n. 3, p. 231-237, maio 2008. DOI: 10.1016/j.plasmid.2008.01.001.

RODRIGUES, T.E.; SOUZA, V.E.P.; MONTEIRO, R.A.; GERHARDT, E.C.M.; ARAÚJO,

L.M.; CHUBATSU, L.S. SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; HUERGO, L.F. In vitro interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the PII protein GlnZ. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1814, p. 1203–1209, 2011.

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

ROZBEH, R.; FORCHHAMMER, K. Split NanoLuc technology allows quantitation of interactions between PII protein and its receptors with unprecedented sensitivity and reveals transient interactions. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 12535, 15 jun. 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-91856-2.

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

SACOMBOIO, E.; KIM, E.; CORREA, H.; BONATO, P.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; DE SOUZA, E.; CHUBATSU, L.; MÜLLER-SANTOS, M. The transcriptional regulator NtrC controls glucose-6-phosphate dehydrogenase expression and polyhydroxybutyrate synthesis through NADPH availability in *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12649-0>.

SANTOS, A. R. S.; GERHARDT, E. C. M.; MOURE, V. R.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIAMANTI, R.; HÖGBOM, M.; HUERGO, L. F. Kinetics and structural features of dimeric glutamine-dependent bacterial NAD<sup>+</sup> synthetases suggest evolutionary adaptation to available metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 19, p. 7397-7407, 11 maio 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002241. Erratum in: *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, n. 41, p. 15117, 11 out. 2019.

SELIM, K. A.; HAFFNER, M.; WATZER, B.; FORCHHAMMER, K. Tuning the *in vitro* sensing and signaling properties of cyanobacterial PII protein by mutation of key residues. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18985, 2019.

SELIM, K. A.; LAPINA, T.; FORCHHAMMER, K.; ERMILOVA, E. Interaction of N-acetyl-l-glutamate kinase with the PII signal transducer in the non-photosynthetic alga *Polytomella parva*: co-evolution towards a hetero-oligomeric enzyme. **FEBS Journal**, v. 287, n. 3, p. 465-482, fev. 2020. DOI: 10.1111/febs.14989.

SANT'ANNA FH, TRENTINI DB, de SOUTO WS, CECAGNO R, DA SILVA SC; SCHRANK IS. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. **J Mol Evol** v. 68, p. 322–336, 2009.

SHARGOOL, P. D., JAIN, J. C., MCKAY, G. Ornithine biosynthesis, and arginine

biosynthesis and degradation in plant cells. **Phytochemistry** v. 27, p. 1571–1574, 1988.

SHEVELEVA, E. V.; HALLICK, R. B. Recent horizontal intron transfer to a chloroplast genome. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 2, p. 803–810, 2004.

SLOCUM, R. D. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 729–745, 2005.

STEENHOUDT, O. VANDERLEYDEN, J.. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology**. Reviews 24, p.487-506, 2000.

SON, R. S; RHEE, S. G. Cascade Control of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p.8690-8695, 1987.

TEIXEIRA, P. F.; JONSSON, A.; FRANK, M.; WANG, H.; NORDLUND, S. Interaction of the signal transduction protein GlnJ with the cellular targets AmtB1, GlnE and GlnD in *Rhodospirillum rubrum*: Dependence on manganese, 2-oxoglutarate and the ADP/ATP ratio. **Microbiology**, v. 154, n. 8, p. 2336–2347, 2008.

TIEN, T. M., GASKINS, M. H., and HUBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum*L). **Appl. Environ. Microbiol.** v. 37, p. 1016–1024, 1979.

TRUAN, D; HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S.; MERRICK, M.; LI, X.-D.; WINKLER F.K. A New P(II) Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**. v.. 400, n.3, p. 531-539, 2010.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and Characterisation of the *Azospirillum brasilense* glnD Gene and Analysis of a glnD Mutant. **Molecular genetics and genomics: MGG**, v. 266, n. 5, p. 813–820, 2002.

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 21, p. 133-146, 1996

VLASOVA, V.; LAPINA, T.; ZALUTSKAYA, Z.; CHENG, Q.; ERMILOVA, E. Characterization of the unusual PII protein with elongated T-loop from *Micromonas pusilla*. **Protistology**, 2025. DOI: 10.21685/1680-0826-2025-19-1-2.

WATZER, B.; ENGELBRECHT, A.; HAUF, W.; STAHL, M.; MALDENER, I.; FORCHHAMMER, K. Metabolic pathway engineering using the central signal processor PII. **Microbial Cell Factories**, v. 14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0384->

## 4.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; ZEEKS, J. C. Assimilation of  $^{13}\text{NH}_4^+$  by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 4211-4214, 1987.

WINTER, G.; TODD, C.; TROVATO, M.; FORLANI, G.; FUNCK, D. Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>.

WOLFE, D. M.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 19, p. 6861–6869, 2007.

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**, v. 282, n. 1, p. 149-165, 1998. doi: 10.1128/AEM.00039-20.

XU, M.; RAO, Z.; DOU, W.; JIN, J.; XU, Z. Site-directed mutagenesis studies on the l-arginine-binding sites of feedback inhibition in N-acetyl-l-glutamate kinase (NAGK) from *Corynebacterium glutamicum*. **Current Microbiology**, v. 64, p. 164-172, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0042-y>.

XU, M.; TANG, M.; CHEN, J.; YANG, T.; ZHANG, X.; SHAO, M.; XU, Z.; RAO, Z. PII signal transduction protein GlnK alleviates feedback inhibition of N-acetyl-l-glutamate kinase by l-arginine in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 8, e00039-20, 1 abr. 2020. DOI: 10.1128/AEM.00039-20.

YANG, X. Conformational dynamics play important roles upon the function of N-acetylglutamate kinase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 3485-3492, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8237-1>.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. In: STANLEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, M. S. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York. 943p. 1992.

ZHANG C, WEI ZH, YE BC. Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in *Escherichia coli* cells by a fluorescence resonance energy transferbased biosensor. **Appl Microbiol Biotechnol**. 97, p. 8307–8316, 2013.

ZHANG C, YE BC. A single fluorescent protein-based sensor for in vivo 2-oxogluatarate detection in cell. **Biosens Bioelectron**, v. 54, p. 15–19, 2014.

ZHANG, Y., R. H. BURRIS, P. W. LUDDEN, G. P. ROBERTS. Regulation of nitrogenfixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v, 152, p. 195–204, 1997.

ZHANG, YAOPING et al. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6781-6788, 1993.