

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALVINA FERNANDA DE VARGAS

**Caracterização bioquímica dos homólogos de glutamina sintetase em
Paenibacillus sonchi SBR5**

Porto Alegre
2019

ALVINA FERNANDA DE VARGAS

**Caracterização bioquímica dos homólogos de glutamina sintetase em
Paenibacillus sonchi SBR5**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Co-orientadora: Dra. Gabriela de Carvalho Fernandes

Porto Alegre
2019

À minha mãe,

Clelia

AGRADECIMENTOS

Foi uma longa jornada até aqui, mas olhando para trás, percebo que sozinha não teria conseguido. A urgência da vida acadêmica por vezes nos faz focar na estrada pela qual seguimos e esquecer de agradecer aos que correm ao nosso lado.

Em primeiro lugar agradeço à minha família, minha mãe Clelia por não medir esforços para me ajudar e por ser o meu maior exemplo na vida. Meu pai Getulio, que faleceu recentemente, mas sempre foi meu melhor amigo. Admiro vocês por tudo que são, mas, principalmente, pelo caráter, pela força e pelo amor incondicional que deram a mim e aos meus irmãos Célia e Getulio Jr. Vocês são o meu motivo para nunca desistir, amo vocês.

Agradeço ao meu amigo Renan, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Você é um irmão, obrigada por tudo! A todos os meus amigos, sou privilegiada por ter vocês em minha vida.

Aos colegas de laboratório, sempre compreensivos e dispostos a compartilhar o que sabem.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia, pela oportunidade de fazer parte da equipe maravilhosa e acolhedora que é o Núcleo de Microbiologia Agrícola e por todo o apoio.

Agradeço, também, à melhor co-orientadora que poderia ter tido Dra. Gabriela de Carvalho Fernandes, por todos os ensinamentos.

Ao CNPq, à Newton Foundation e ao Departamento de Genética da UFRGS por tornarem possível a realização desse projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 O gênero <i>Paenibacillus</i>.....	8
1.2 Glutamina sintetase.....	9
1.3 <i>Paenibacillus sonchi</i> SBR5.....	9
JUSTIFICATIVA.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Indução da expressão de GSL1, GLS2 e GLS3 em <i>E. coli</i> BL21.....	11
Purificação das proteínas de interesse.....	13
Avaliação da atividade biossintética das proteínas GSs-like purificadas.....	13
Teste <i>in vivo</i> da atividade das GSs-like de <i>P. sochi</i> SBR5.....	14
Teste da atividade das GSs-like purificadas frente a diferentes inibidores.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
Purificação das proteínas GSs-like de SBR5.....	14
Ensaio de atividade biossintética das GSs-like purificadas frente a diferentes substratos.....	16
Análise <i>in vivo</i> da possível utilização de poliaminas como fonte de carbono ou nitrogênio por SBR5.....	18
Teste de possíveis inibidores para GSL1 e GLS2.....	20
PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

A enzima glutamina sintetase (GS), peça-chave no metabolismo do nitrogênio, apresenta papel primordial na biossíntese de L-glutamina e assimilação desse elemento para a grande maioria das bactérias. GS atua como catalisadora da reação que forma L-glutamina a partir de ácido L-glutâmico e amônio, sendo necessário gasto de ATP para tal. Dessa maneira, o íon amônio é introduzido ao metabolismo celular pela GS e pela glutamato sintase, produzindo L-glutamina e L-glutamato, respectivamente. O gênero *Paenibacillus* é alvo de diversos estudos; no entanto, ainda se fazem necessárias mais análises genômicas, tendo em vista sua importância para a biotecnologia e o agronegócio, ampla distribuição, função nas comunidades microbianas e fixação de nitrogênio, observada em várias espécies do gênero. *Paenibacillus riograndensis* (SBR5), sinônimo heterotípico posterior de *P. sonchi* (X19-5 T), bactéria isolada de trigo (*Triticum aestivum*), quando comparada a outras do gênero apresenta peculiaridades. SBR5 contém, em seu genoma, três genes codificadores de proteínas homólogas à GS (nomeadas no presente estudo como “GSs-like” – GSL1, GSL2 e GSL3). Este estudo visa à caracterização das funções de tais proteínas. Para a expressão das três proteínas (GSL1, GSL2 e GSL3) foi utilizada *Escherichia coli* BL-21 e o plasmídeo pASK-IBA3, a qual foi confirmada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Utilizando-se o resina (meio) StrepTactin™ Sepharose™ High Performance (GE Healthcare), as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade. Após a purificação e diálise das proteínas, as mesmas foram quantificadas pelo método de Bradford e armazenadas à -20°C, para posterior análise. Foi utilizado o método colorimétrico baseado na liberação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise de ATP para medição da atividade biossintética das GSs-like. Observou-se atividade de 11,6 e 9,63 nmol Pi/mg para GSL1 e GSL2, respectivamente, enquanto GSL3 não apresentou atividade biossintética. Tendo em vista uma possível semelhança entre as GSs em questão e outras proteínas caracterizadas na literatura, foi realizado um ensaio colorimétrico para verificar atividade na presença de poliaminas como substrato, em substituição ao amônio. Foi observada atividade para as três GSs-like, em diferentes níveis, mostrando a capacidade dessas enzimas em utilizar poliaminas como fonte de nitrogênio. Testando-se possíveis inibidores foi notada inibição de GSL1 apenas por glutamina, sendo as outras proteínas estimuladas pelos demais substratos avaliados.

Palavras-chave: assimilação de nitrogênio, metabolismo de nitrogênio, atividade biossintética.

ABSTRACT

The enzyme glutamine synthetase (GS), a key part in nitrogen metabolism, plays a major role in L-glutamine biosynthesis and assimilation of this element for the vast majority of bacteria. GS acts as a catalyst for the reaction that forms L-glutamine from L-glutamic acid and ammonium, requiring ATP expense. Thus, the ammonium ion is introduced to cellular metabolism by GS and glutamate synthase, producing L-glutamine and L-glutamate, respectively. The genus *Paenibacillus* is the target of several studies; however, further genomic analysis is still needed, given its importance for biotechnology and agribusiness, broad distribution, microbial function and nitrogen fixation, observed in several species of the genus. *Paenibacillus riograndensis* (SBR5), posterior heterotypic synonym of *P. sonchi* (X19-5 T), bacterium isolated from wheat (*Triticum aestivum*), when compared to others of the genus presents peculiarities. SBR5 contains in its genome three genes coding for GS homologous proteins (named in the present study as "GSs like" - GSL1, GSL2, and GSL3). This study aims to characterize the functions of such proteins. For expression of the three proteins (GSL1, GSL2, and GSL3), *Escherichia coli* BL-21 and plasmid pASK-IBA3 were used, and their expression was confirmed on polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Using StrepTactin™ Sepharose™ High Performance resin (medium) (GE Healthcare), proteins were purified by affinity chromatography. After protein purification and dialysis, they were quantified by the Bradford method and stored at -20°C for later analysis. The colorimetric method based on the release of inorganic phosphate resulting from ATP hydrolysis was used to measure the biosynthetic activity of GSs-like. Activity of 11.6 and 9.63 nmol Pi/mg was observed for GSL1 and GSL2, respectively, while GSL3 showed no biosynthetic activity. In view of a possible similarity between the GSs in question and other proteins characterized in the literature, a colorimetric assay was performed to verify activity in the presence of polyamines as substrate, replacing ammonium. Activity was observed for the three GSs-like, at different levels, showing the ability of these enzymes to use polyamines as nitrogen source. Testing for possible inhibitors, GSL1 inhibition was noted only by glutamine, and the other proteins were stimulated by the other substrates evaluated.

Keywords: nitrogen assimilation, nitrogen metabolism, biosynthetic reaction.

INTRODUÇÃO

O gênero *Paenibacillus*

Bacilos fazem parte de um grande grupo de micro-organismos formadores de endósporos. Esse grupo possui várias famílias e gêneros, anteriormente descritos como pertencentes ao gênero *Bacillus*, que foram reclassificados em inúmeros outros gêneros e famílias (Beneduzi et al. 2009).

Proposto por Ash et al. (1994), o gênero *Paenibacillus* pertence à família 'Paenibacillaceae'. As bactérias pertencentes a esse gênero apresentam ampla distribuição e papel imprescindível para as comunidades microbianas (Reva et al. 1995). Dessa maneira, podem ser encontradas livres no solo ou associadas a plantas e mostram grande potencial, como inoculantes, para as áreas da agricultura e biotecnologia (Beneduzi et al. 2009).

A grande maioria dos seres vivos é incapaz de utilizar o nitrogênio diretamente do ar atmosférico, onde ele se encontra na forma de N_2 . Portanto, é necessário que seja realizado o processo de fixação biológica desse gás, feito por algumas bactérias e arqueas, majoritariamente. Tais micro-organismos apresentam a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 transformando-o em duas moléculas de amônia, com gasto de ATP (Beneduzi et al. 2009). A amônia é, então, utilizada para a síntese de glutamina, em reações catalisadas pela enzima Glutamina Sintetase (GS), foco deste trabalho. Tal reação é frequentemente descrita para diversas espécies do gênero *Paenibacillus*, como, por exemplo, *P. polymyxa* (Grau e Wilson, 1962), *P. macerans*, *P. durus* (*P. azotofixans*), *P. peoriae* (Montefusco et al. 1993), *P. borealis* (Elo et al. 2001), *P. graminis*, *P. odorifer* (Berge et al. 2002), *P. brasilensis* (von der Weid et al. 2002), *P. massiliensis* (Roux e Raoult, 2004), *P. wynnii* (Rodríguez-Díaz et al. 2005), *P. sabinae* (Ma et al. 2007a), *P. zanthoxyli* (Ma et al. 2007b), *P. donghaensis* (Choi et al. 2008) e *P. forsythiae* (Ma e Chen, 2008). Além da grande capacidade de fixação de nitrogênio, algumas dessas bactérias também podem promover maior crescimento vegetal, por produzirem fitormônios (auxinas e citocininas) e substâncias antimicrobianas (Rosado et al. 1996). Muitas espécies de rizobactérias de promoção de crescimento (PGPR, do inglês *plant growth-promoting rhizobacteria*) foram descritas até o momento (Lebuhn et al. 1997; Timmusk e Wagner, 1999; Timmusk et al. 1999; Helbig, 2001; von der Weid et al. 2003); no entanto, a grande maioria permanece desconhecida e sua identificação seria importante para a formulação de novos inoculantes para melhorar a produção agrícola (Beneduzi et al. 2009).

Glutamina sintetase

Para a maioria das bactérias, a glutamina sintetase (GS) é a enzima principal para a metabolização do nitrogênio e apresenta dupla funcionalidade, agindo na biossíntese de L-glutamina e na assimilação de nitrogênio. GS tem a função de catalisar a formação de L-glutamina a partir de ácido L-glutâmico e amônia. Desse modo, a incorporação do amônio pelo metabolismo celular fica a cargo da GS em conjunto com a glutamato sintase, na rota GS/GOGAT, onipresente em bactérias e que produz L-glutamina e L-glutamato, os doadores principais para as reações biossintéticas (Rexer et al. 2006).

Existem, pelo menos, três formas distintas de GS (Brown et al. 1994), sendo os genes que codificam as GS de tipo I (GS-I, alvo do presente estudo) encontrados em bactérias e arqueas, enquanto que os que codificam as GS de tipo II (GS-II) estão presentes em eucariotos e espécies de *Rhizobium* (Darrow e Knotts, 1977), *Frankia* (Edmands et al. 1987) e *Streptomyces* (Kumada et al. 1990). Os genes codificadores das GS de tipo III (GS-III), encontrados em *Bacteroides fragilis* (Hill et al. 1988), *Rhizobium leguminosarum* (Chiurazzi et al. 1992) e *Butyrivibrio fibrisolvens* (Goodman e Woods, 1993), são muito diferentes dos que codificam as GSI e GSII, dificultando a determinação exata da relação evolutiva desses genes. Os três tipos de GS's distinguem-se pelo comprimento da cadeia, arranjo oligomérico e recursos regulatórios. As enzimas GS-I e GS-III formam dodecâmeros compostos pela sobreposição de dois hexágonos, enquanto as enzimas GS-II formam um sanduíche de anéis pentagonais (Ladner et al. 2012).

Paenibacillus sonchi SBR5

A bactéria *Paenibacillus riograndensis* (SBR5), sinônimo heterotípico de *P. sonchi* (X19-5^T), cuja análise filogenética do gene do rRNA 16S demonstrou a formação de um clado composto por *P. sonchi* X19-5^T, *P. riograndensis* SBR5^T e *Paenibacillus* sp. (**Figura 1**), é uma bactéria fixadora de nitrogênio isolada de *Triticum aestivum* que apresenta características peculiares quando comparada a outras do gênero (Sant'Anna et al. 2017). SBR5 apresenta três genes codificadores de proteínas homólogas à GS (nomeadas no presente estudo como "GSs-like" – GSL1, GSL2 e GSL3). De acordo com o observado na literatura, outras bactérias podem apresentar, deste mesmo modo, homólogos de GS com características distintas. Um exemplo é encontrado em *P. aeruginosa* que apresenta sete genes codificadores de proteínas homólogas à GS, sendo que seis destas proteínas podem utilizar como fontes alternativas de

carbono e nitrogênio poliaminas, como espermidina e putrescina, em variadas concentrações (Ladner et al. 2012).

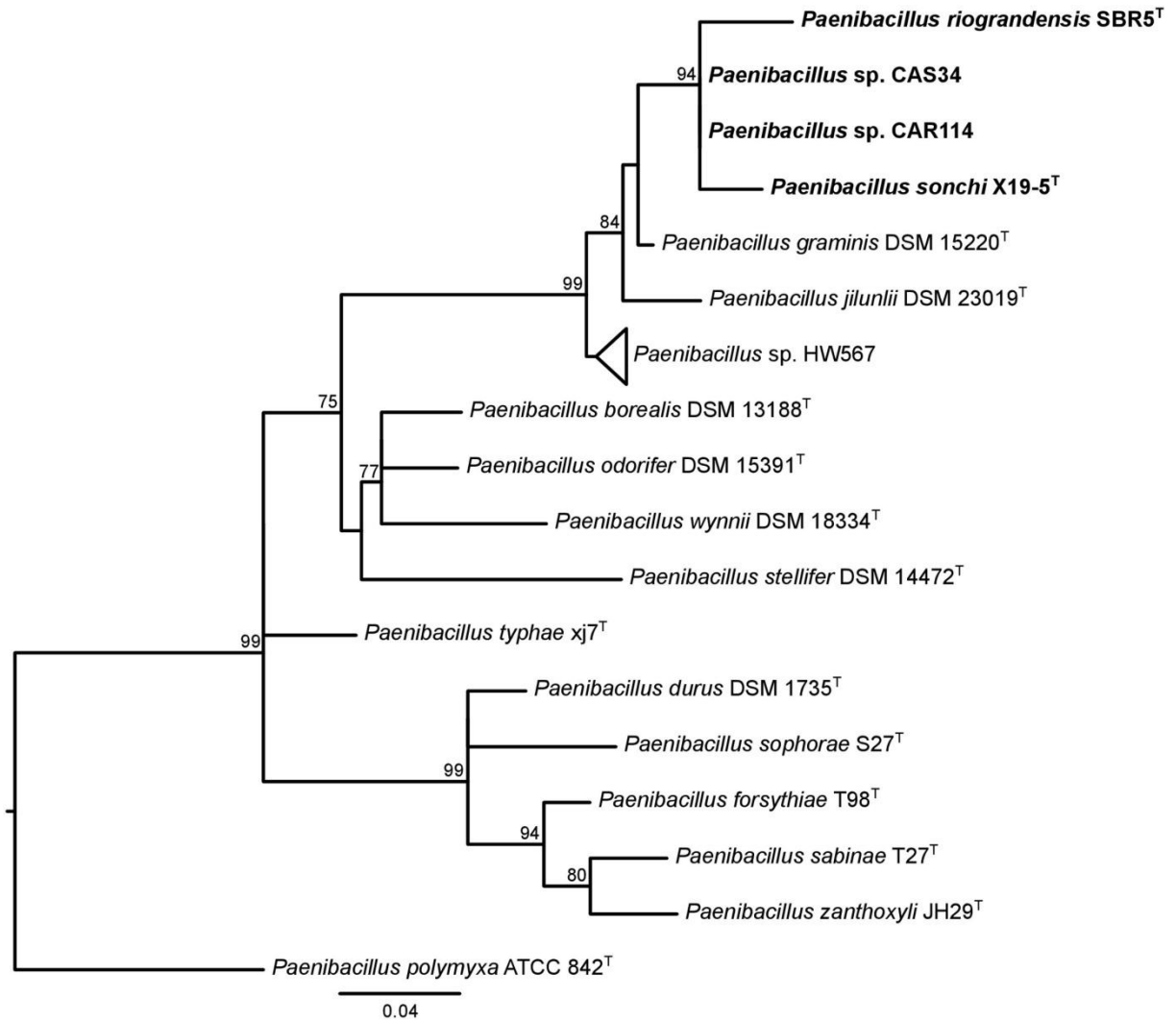


Figura 1: Filogenia do gene rRNA 16S de espécies de *Paenibacillus* evidenciando o clado composto por membros da espécie *P. sonchi* (em negrito) Retirado de Sant’Anna et al. (2017).

JUSTIFICATIVA

Os benefícios obtidos pela utilização na agricultura de diversas espécies do gênero *Paenibacillus* no que tange à fixação do nitrogênio, como diminuição do uso de adubos, minimização dos impactos ambientais causados pelos cultivos, buscando-se utilizar a menor área possível e ainda assim obter uma produção otimizada, tornam o gênero *Paenibacillus* objeto de diversos estudos. No entanto, ainda se fazem necessárias mais análises genômicas e bioquímicas devido à sua relevância para as lavouras, ampla distribuição, importante função

nas comunidades microbianas (Beneduzi et al., 2009) e nitrificação, observada em diversas espécies do gênero. Sabe-se, também, que outra bactéria Gram-positiva, similar à *Paenibacillus sonchi*, *Bacillus subtilis*, apresenta apenas um gene codificador de glutamina sintetase em sua maquinaria. Dessa forma, surgiu o questionamento a respeito das reais funções das três homólogas à GS encontradas em *P. sonchi* SBR5. Tais proteínas apresentam atividades de glutamina sintetase clássica, ou elas são capazes de realizar outras funções na célula? O presente trabalho buscou avaliar as atividades dessas proteínas em relação a diferentes substratos e inibidores.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as funções das proteínas homólogas à glutamina sintetase codificadas pelo genoma de *P. sonchi* SBR5.

MATERIAL E MÉTODOS

Indução da expressão de GSL1, GLS2 e GLS3 em E. coli BL21

A primeira etapa desse trabalho teve início com a introdução dos plasmídeos pASK-IBA3plus (**Figura 2**) recombinantes, previamente construídos (Fernandes, comunicação pessoal), que continham os genes de interesse, com o objetivo de sintetizar as proteínas alvo em *E. coli*. Esses plasmídeos apresentam em sua constituição a Strep-tag (uma pequena sequência de oito aminoácidos), imprescindível para a posterior purificação das proteínas, pela formação de proteínas de fusão. A transformação das células de *Escherichia coli* BL21 foi feita por eletroporação, efetuando choques de 1250 V para introduzir as construções do vetor pASK-IBA3 portando as sequências codificadoras das três proteínas alvo do estudo (GSL1, GSL2, GSL3 - Glutaminas Sintetases “like”).

rpm, sendo separado em fração solúvel e insolúvel. Usando a técnica de SDS-PAGE (conforme Sambrook e Russel, 2001), que é a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, fez-se a verificação da eficácia da indução, a fim de observar a presença das proteínas alvo.

Purificação das proteínas de interesse

Uma vez confirmada a presença das proteínas de interesse nos extratos totais celulares, o processo seguinte foi a purificação, realizada por cromatografia de afinidade. Essa etapa foi possibilitada devido à presença da Strep-tag codificada no plasmídeo de expressão, que confere a capacidade da proteína de fusão se ligar à matriz da coluna. Tal processo foi realizado com a matriz comercial Streptactin Sepharose® High Performance (GE Healthcare), de acordo com as indicações do fabricante.

Após a purificação, as proteínas obtidas foram dialisadas em tampão de Tris-HCl (pH 7,4; 50mM) contendo NaCl (100 mM), MgCl₂ (1 mM), EDTA (0,5 mM) e Glicerol (50%) (imprescindível para o armazenamento a -20°C, evitando a formação de cristais de H₂O) sob refrigeração por aproximadamente 14 h. Ao final, foi realizada a quantificação das proteínas obtidas pela técnica de Bradford, tendo como referência uma curva-padrão preparada com albumina de soro bovino (BSA) e efetuando medição da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Avaliação da atividade biossintética das proteínas GS-like purificadas

Para avaliar a atividade biossintética das proteínas GS-like purificadas, foi realizado um ensaio colorimétrico de microtitulação baseado na liberação de fosfato inorgânico resultante da hidrólise do ATP pela GS (Gawronski e Benson, 2004). Nesse procedimento foi utilizada uma mistura de reação (90 µL) composta por 100 mM Mops (pH 7,5), 250 mM glutamato monossódico, 10 mM ATP, 50 mM MgCl₂ e as GSs-like, nas concentrações de: 1,35 µg/µl para GSL1; 2,7 µg/µl para GLS2 e 0,63 µg/µl para GSL3. Para a mistura preparada para a curva padrão de fosfato inorgânico (nas concentrações de 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12, 15 e 10 mM de Pi), foram utilizados os mesmos reagentes e 50 mM de NH₄Cl.

As reações foram iniciadas adicionando-se, com auxílio de micropipeta, 10 µl do substrato, 50 mM NH₄Cl, à mistura de reação (90 µL), estabilizada à temperatura de 27°C, previamente por 5 min, em termociclador. Após outros 5 min., 50 µL desta reação foram transferidos, da mesma forma, para 150 µL de uma solução (A) de 12% (w/v) de ácido

ascórbico em ácido clorídrico (1 N) e (B): 2% de molibdato de amônio em H₂O, em proporção de dois para um, previamente disposta em placa de 96 poços, por mais 5 min. Após esse período, foram adicionados 150 µL de outra solução, contendo 2% citrato de sódio tribásico e 2% ácido acético, em H₂O, aguardando-se no mínimo 15 min para que a reação estivesse equilibrada, em temperatura ambiente. Posteriormente, foi lida a absorbância em espectrofotômetro a 655 nm e os dados foram analisados em Excel (Microsoft).

Uma vez identificadas as GSs funcionais, as especificidades de suas atividades foram avaliadas utilizando o mesmo ensaio. Foram testados, além dos substratos clássicos para a reação biossintética de GS utilizados nos ensaios acima descritos (glutamato, amônio e ATP), também substratos alternativos, em substituição ao amônio: as poliaminas putrescina, espermidina, etanolamina e isopropilamina (Ladner et al. 2012).

Teste de crescimento de P. sochi SBR5 em substratos alternativos

Após os testes *in vitro*, fez-se um teste *in vivo* para verificar a capacidade de SBR5 se multiplicar em diferentes substratos, usando as poliaminas como fonte de nitrogênio e/ou carbono. Para tal, utilizou-se um meio definido [Meio M: K₂HPO₄ (3,8 g/L), NaH₂PO₄.H₂O (2,8 g/L), CaCl₂.H₂O (0,026 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,0614 mg/L), MnSO₄.H₂O (0,336 mg/L), NaMoO₄.2H₂O (0,076 g/L), citrato férrico (0,036 g/L), ácido p-aminobenzoico (10 µg/L) e biotina (5 µg/L), ágar puro, contendo duas concentrações diferentes de putrescina, espermidina, etanolamina e isopropilamina (25 e 50 mM), bem como sacarose (24 mM) ou NH₄⁺(20 mM), para cada amostra.

Teste da atividade das GS-like purificadas frente a diferentes inibidores

Posteriormente, a modulação das proteínas foi verificada testando-se potenciais inibidores da atividade de GSs em diferentes organismos: ácido p-aminobenzoico, histidina, ácido 3-oxopentanoico, glicina, alanina, cisteína e glutamina, em uma concentração de 0,005 mol/L, utilizando-se o ensaio de microtitulação anteriormente descrito, sendo utilizado como substrato iniciador da reação o glutamato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação das proteínas GSs-like de SBR5

As três proteínas GSs-like de SBR5 passaram pelos processos de indução e expressão em *E. coli* BL21 e análise em gel de poliácridamida, no qual foram confirmadas as suas expressões, porém, para a GSL1 foi observado melhor resultado, ou seja, bandas mais visíveis (**Figura 3**). Dessa maneira, posteriormente, foram realizados todos os procedimentos necessários para a purificação, diálise e quantificação pelo método de Bradford para as três proteínas. Após o processo de lise para liberação da proteína retida do meio intracelular de *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade, foi realizada a análise por SDS-PAGE, no qual foi possível confirmar a presença da proteína GSL1, tendo em vista o tamanho esperado de 51,6 kDa, mostrado pelo marcador de peso molecular (**Figura 4**).

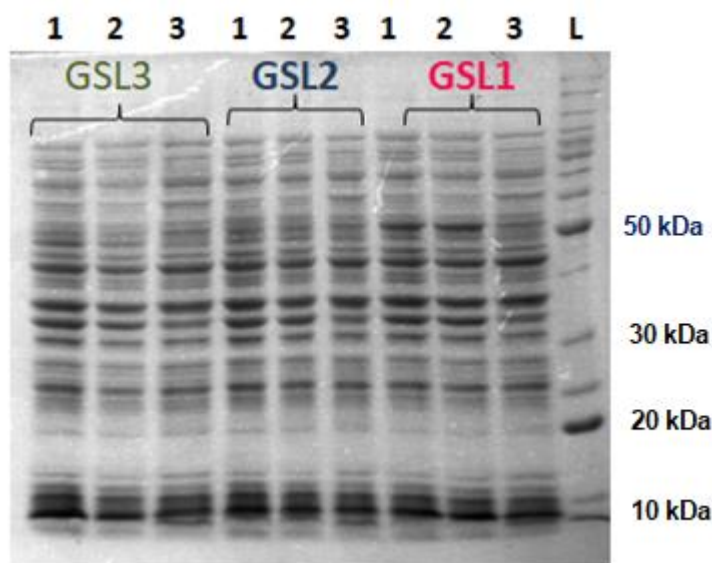


Figura 3: Gel de poliácridamida 10% mostrando o resultado da indução das proteínas recombinantes de SBR5: GSL1, GSL2 e GSL3 (1 e 2: Extrato total das proteínas, clones induzidos independentes; 3: Amostra controle, sem adição de indutor (AHT), L: Marcador de peso molecular).

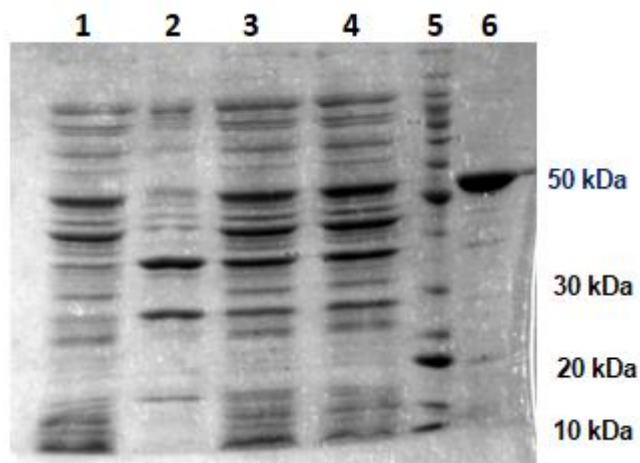


Figura 4: Gel de poliacrilamida 10% mostrando as frações da purificação da proteína recombinante GSL1 de SBR5: 1: Fração solúvel; 2: Fração insolúvel; 3: Lisado do clone 1; 4: Lisado do clone 2; 5: Marcador de peso molecular, 6: SBR5 GSL1 purificada.

Posteriormente, também foram purificadas e analisadas em SDS-PAGE as proteínas GSL2 e GSL3 (**Figura 5**) e reanalisada a GSL1. Nessa nova análise utilizaram-se os valores obtidos na quantificação pelo método de Bradford para que fossem aplicadas no gel quantidades mais uniformes das proteínas purificadas. De acordo com a quantificação por Bradford, obteve-se os valores de 1, 346 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para GSL1, 2,693 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para GSL2 e 0,630 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para GSL3. Portanto, após a análise por SDS-PAGE confirmou-se a presença das proteínas em questão purificadas, as quais apresentaram tamanho molecular de acordo com o esperado: 51,6 kDa para GSL1, 54,0 kDa para GSL2 e 52,3 kDa para GSL3 (**Figura 5**).

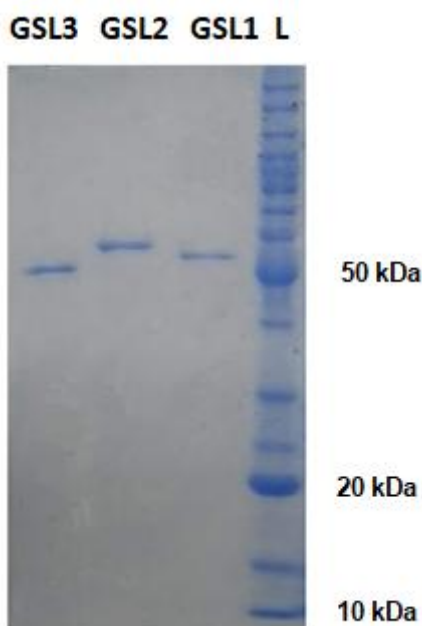


Figura 5: Gel de poliacrilamida 10% mostrando o resultado da purificação de GSL1, GSL2 e GSL3 (~1µg de cada proteína). Massa molecular: GSL1: 51,6 kDa; GSL2: 54,0 kDa; GSL3: 52,3 kDa. L: Marcador de peso molecular.

Ensaio de atividade biossintética das GSs-like purificadas frente a diferentes substratos

Por meio do ensaio colorimétrico descrito em Material e Métodos foi observada atividade biossintética de GS para as proteínas GSL1 e GSL2 (11,6 e 9,63 nmol Pi/mg, respectivamente) (**Figura 6**), quando foi utilizado o substrato convencional para glutamina sintetase (no caso, cloreto de amônio).

De acordo com Rexer et al. (2007), *Streptomyces coelicolor* A3, uma bactéria Gram-positiva, possui três genes semelhantes a *glnA*. O gene *glnA* é o gene codificador da glutamina sintetase (codificando GSI), além do gene *glnII* (que codifica GSII), nesse organismo. Estes três genes adicionais não estão envolvidos na síntese de L-glutamina e assimilação de nitrogênio para a bactéria, sugerindo-se o papel de catalisador da reação dependente de ATP de α -glutamil-isopropilamida sintetase para o produto de um deles (*glnA4*) (Wäsch et al. 2002). *P. aeruginosa*, espécie Gram-negativa, possui em seu genoma sete genes que codificam proteínas homólogas à GS, as quais apresentam especificidade sobreposta à espermidina, putrescina e outras poliaminas (Ladner et al. 2012). Ainda, foi observado que seis dessas proteínas são induzidas na presença de espermidina e putrescina. No entanto, a sétima, denominada de PA5508, não apresenta tais atividades, sendo sua atividade desconhecida.

A fim de investigar a atividade de GSL3 foi testada, então, a capacidade de uso de poliaminas (isopropilamina, etanolamina, espermidina e putrescina), como visto na literatura (Ladner et al., 2012), pelas enzimas GSs-like como fontes alternativas de nitrogênio e carbono. Como demonstrado na **Figura 7**, foram observadas atividades para as três proteínas, porém em diferentes níveis, corroborando a hipótese de atividade não-clássica de glutamina sintetase para GSL3.

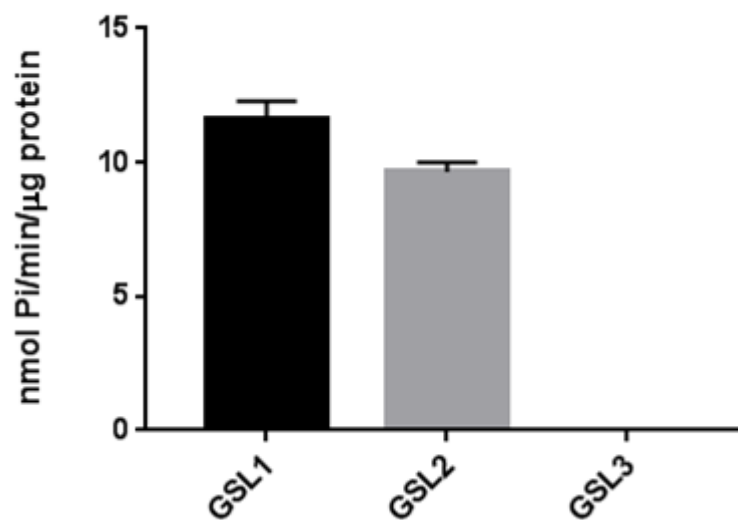


Figura 6: Atividade biossintética específica de GS, medida em nmol Pi/min/μg proteína, para as "GSs-like" purificadas de *Paenibacillus sonchi* SBR5. ND = atividade não observada.

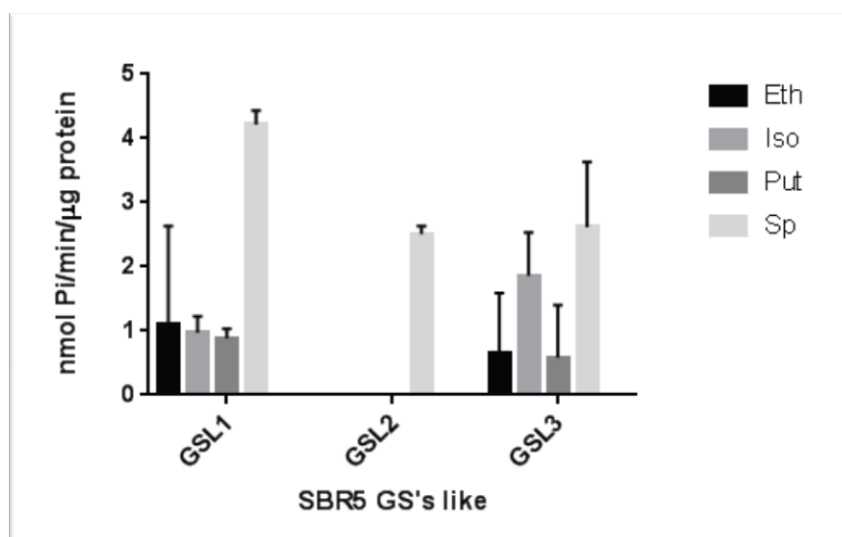


Figura 7: Atividade biossintética, medida em nmol Pi/min/μg proteína, para as GSs-like de SBR5 na presença de poliaminas e amônio. Eth: etanolamina, Iso: isopropilamina, Put: putrescina, Sp: espermidina.

Análise in vivo da possível utilização de poliaminas como fonte de carbono ou nitrogênio por SBR5

Uma vez que foi observada a atividade das GSs-like de SBR5 de utilizar poliaminas como fonte de nitrogênio *in vitro* foi realizado o teste *in vivo*, por meio de um experimento de crescimento, visando à observação da capacidade de multiplicação de SBR5 em meio contendo poliaminas em substituição à amônia ou como fonte de carbono. Na **Figura 8** está exemplificado como foi feito o experimento.

Observou-se crescimento bacteriano nas placas contendo as poliaminas putrescina e etanolamina como fontes alternativas de nitrogênio, tendo sacarose como fonte de carbono (**Figura 9**). Quando essas poliaminas foram utilizadas como fontes de carbono, substituindo a fonte original (sacarose), pouco crescimento foi observado quando a concentração destas poliaminas foi de 25 mM. Crescimento nulo foi observado quando a concentração destas foi de 50 mM. Quando foi utilizada isopropilamina como fonte de nitrogênio foi observado pouco crescimento na concentração de 25 mM e crescimento nulo na concentração de 50 mM. O oposto foi observado para espermidina como fonte de nitrogênio. Crescimento nulo foi observado quando a fonte original de nitrogênio foi trocada por isopropilamina, independente da concentração e pouco crescimento foi observado quando espermidina, na concentração de 25 mM foi usada em substituição ao amônio. Ao serem substituídas totalmente as fontes originais (sacarose e NH_4^+) pelas poliaminas não foi observado crescimento algum (**Figura 9**, última coluna), o que indica a possível capacidade de SBR5 de utilizar as poliaminas como fonte de nitrogênio, mas não de carbono.

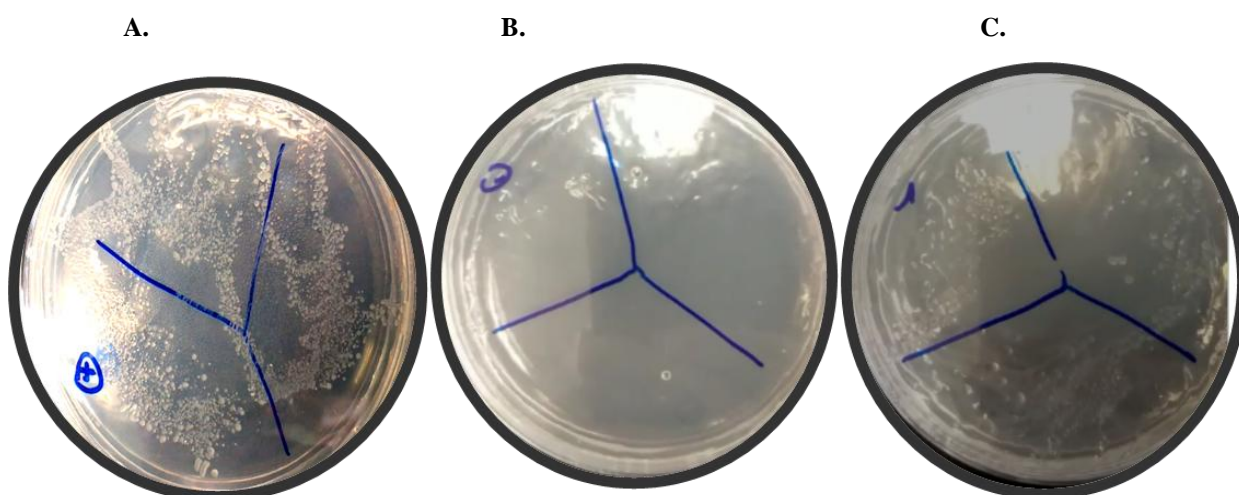


Figura 8: Amostras do experimento de crescimento bacteriano, utilizando-se poliaminas como substrato alternativo: A: Controle positivo: meio M contendo Sacarose 0,8%/24 mM e NH_4^+ 20 mM; B: meio M sem fonte de carbono ou nitrogênio, controle negativo; C: Meio M contendo Sacarose 24 mM/0,8% e Putrescina 25 mM, como fonte de nitrogênio.

		Sacarose 0,8%/24mM	NH ₄ ⁺ 20mM	Poli
25 mM	Putrescina	+++	+	-
50 mM		+++	-	-
25 mM	Etanolamina	+++	+	-
50 mM		+++	-	-
25 mM	Isopropilamina	+	-	-
50 mM		-	-	-
25 mM	Espermidina	-	+	-
50 mM		+++	-	-

+++ : crescimento

+ : pouco crescimento

- : zero crescimento

Figura 9: Tabela mostrando os resultados do experimento de crescimento de SBR5 em meio contendo poliaminas como fonte de nitrogênio e/ou carbono. Putrescina, etanolamina, isopropilamina e espermidina, em diferentes concentrações.

Teste de possíveis inibidores para GSL1 e GLS2

Foi avaliada a capacidade de alguns compostos inibirem a atividade de glutamina sintetase das GSs-like que apresentaram atividade clássica de GS (GSL1 e GSL2). Na presença de possíveis inibidores foram observadas respostas diferentes, indicando características distintas entre as duas enzimas. Apenas glutamina apresentou caráter inibitório para GSL1, caracterizando um *feedback* negativo, corroborando a hipótese de atividade clássica para tal proteína. Os demais potenciais inibidores, aparentemente, tiveram atividade estimulante apenas para GSL1, uma vez que os níveis de fosfato inorgânico liberado foram mais elevados, em comparação ao controle (**Figura 10**). Desse modo, ao invés de serem considerados inibidores, ácido p-aminobenzóico (testado apenas para GSL1), histidina, ácido 3-oxopentanóico, glicina, alanina e cisteína foram considerados potenciais efetores para GSL1.

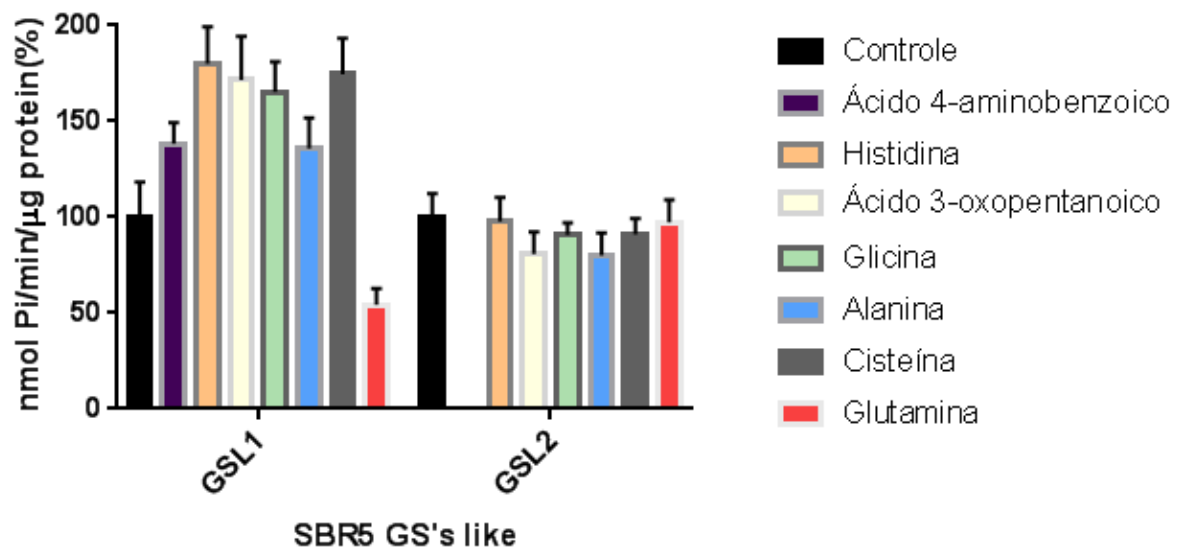


Figura 10: Atividade biossintética, medida em nmol Pi/min/μg de proteína, de GSL1 e GSL2, na presença de potenciais inibidores (0,005 mol/L): ácido p-aminobenzoico, histidina, ácido 3-oxopentanoico, glicina, alanina, cisteína e glutamina, respectivamente.

PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que GSL1 e GSL2 de SBR5 apresentam atividade de GS; SBR5, possivelmente, utiliza poliaminas como fontes alternativas de nitrogênio e apenas glutamina tem atividade inibitória para as enzimas em questão, sendo apenas para GSL1.

- I. Pretende-se testar a nova preparação de GSL3 com poliaminas e inibidores (novos e antigos), bem como averiguar o crescimento bacteriano em concentrações menores de poliaminas (por exemplo: 7, 5-15 ou 5-10 mM).
- II. Testar atividade biossintética das GSs-*like*, medindo a formação de glutamina.
- III. Testar diferentes concentrações de substrato para determinar as afinidades (Km) das enzimas GSL1 e GSL2.
- IV. Obter mutantes simples, duplos e triplos para os genes codificadores das diferentes GSs.
- V. Caracterizar fenotípica e genotipicamente os mutantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1994). *Paenibacillus* gen. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 51. Int J Syst Bacteriol 44, 852.
- Beneduzi, A., Costa, P. B., Parma, M., Melo, I. S., Bodanese-Zanettini, M. H., & Passaglia, L. M. P. (2009). *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. Int J Syst Evol Microb, 60(1), 128–133.
- Berge, O., Guinebretière, M., Achouak, W., Normand, P. & Heulin, T. (2002). *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. Int J Syst Evol Microbiol 52, 607–616.
- Chiurazzi M, Meza R, Lara M, Lahm A, Defez R, Iaccarino M, Espin G (1992) The *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. Gene 119:1-8.
- Choi, J. H., Im, W. T., Yoo, J. S., Lee, S. M., Moon, D. S., Kim, H. J., Rhee, S. K. & Roh, D. H. (2008). *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment. J Microbiol Biotechnol 18, 189–193.
- Edmunds J, Norridge NA, Benson DR (1987) The actinorhizal root- nodule symbiont *Frankia* sp. strain CpII has two glutamine synthetases. Proc Natl Acad Sci USA 84:6126-6130.
- Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M. & Haahtela, K. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. Int J Syst Evol Microbiol 51, 535–545.
- Gawronski, J. D., & Benson, D. R. (2004). Microtiter assay for glutamine synthetase biosynthetic activity using inorganic phosphate detection. Anal Biochem 327(1), 114–118.
- Goodman H.J., Woods DR (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *Butyrivibrio brisolvans* gene encoding a type III glutamine synthetase. J Gen Microbiol 139:1487–1493
- Grau, F. H. & Wilson, P. W. (1962). Physiology of nitrogen-fixation by *Bacillus polymyxa*. J Bacteriol 83, 490–496.
- Helbig, J. (2001). Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (isolate 18191). J Phytopathol 149, 265–273.
- Hill R. T, Parker J. R, Goodman H. J. K, Jones D. T, Woods D. R. (1988) Molecular analysis of a novel glutamine synthetase of the anaerobe, *Bacteroides fragilis*. J Gen Microbiol 135:3271-3279.
- Kumada Y, Takano E, Nagaoka K, Thompson CJ (1990) *Streptomyces hygrosopicus* has two glutamine synthetase genes. J Bacteriol 172:5343-5351.
- Ladner, J. E., Atanasova, V., Dolezelova, Z., & Parsons, J. F. (2012). Structure and Activity of PA5508, a Hexameric Glutamine Synthetase Homologue. Biochemistry, 51(51), 10121–10123.
- Leigh, J. A., & Dodsworth, J. A. (2007). Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. Ann Rev Microb 61(1), 349–377.
- Lebuhn, M., Heulin, T. & Hartmann, A. (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. FEMS Microbiol Ecol 22, 325–334.
- Ma, Y., Xia, Z., Liu, X. & Chen, S. (2007a). *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. Int J Syst Evol Microbiol 57, 6–11.
- Ma, Y., Zhang, J. & Chen, S. (2007b). *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. Int J Syst Evol Microbiol 57, 873–877.

- Ma, Y. C. & Chen, S. F. (2008). *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 319–323.
- Montefusco, A., Nakamura, L. K. & Labeda, D. P. (1993). *Bacillus peoriae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43, 388–390.
- Reva, O. N., Vyunitskaya, V. A., Reznik, S. R., Kozachko, I. A. & Smirnov, V. V. (1995). Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 45, 409–411.
- Rexer, H. U., Schäberle, T., Wohlleben, W., & Engels, A. (2006). Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microb* 186(6), 447–458.
- Rodríguez-Díaz, M., Lebbe, L., Rodelas, B., Heyrman, J., de Vos, P. & Logan, N. A. (2005). *Paenibacillus wynnii* sp. nov., a novel species harbouring the *nifH* gene, isolated from Alexander Island, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2093–2099.
- Rosado, A. S., Seldin, L., Wolters, A. C. & van Elsas, J. D. (1996). Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 19, 153–164.
- Roux, V. & Raoult, D. (2004). *Paenibacillus massiliensis* sp. nov., *Paenibacillus sanguinis* sp. nov. and *Paenibacillus timonensis* sp. nov, isolated from blood cultures. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1049–1054.
- Sant’Anna, F. H., Ambrosini, A., de Souza, R., de Carvalho Fernandes, G., Bach, E., Balsanelli, E., Passaglia, L. M. P. (2017). Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a Genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-Based Metrics Improve Bacterial Taxonomic Classification. *Front Microbiol* 8, 1849.
- Sambrook, J., Russel, D. W., 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- Timmusk, S. & Wagner, E. G. (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 951–959.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. & Tillberg, E. (1999). Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 31, 1847–1852.
- von der Weid, I., Duarte, G. F., van Elsas, J. D. & Seldin, L. (2002). *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2147–2153.
- von der Weid, I., Alviano, D. S., Santos, A. L., Soares, R. M., Alviano, C. S. & Seldin, L. (2003). Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J Appl Microbiol* 95, 1143–1151.
- Wäsch SI, van der Ploeg JR, Maire T, Lebreton A, Kiener A, Leisinger T. (2002) Transformation of isopropyl- amine to L-alaninol by *Pseudomonas* sp. strain KIE171 involves N-glutamylated intermediates. *Appl Environ Microbiol* 68:2368–2375.