CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA ENZIMA GLNE DE *Herbaspirillum seropedicae*

Nicoli Taísi Ornaghi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Marco Aurelio Schüler de Oliveira. E-mail: ra134020@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Bioquímica e Bioquímica de microrganismos.

Palavras-chave: Metabolismo de nitrogênio; Regulação; GlnE.

RESUMO

A enzima bifuncional GlnE de *Herbaspirillum seropedicae* é responsável pela regulação reversível da Glutamina sintetase (GS), caracterizada como centro metabólico do metabolismo de nitrogênio de bactérias. Em razão de essas enzimas serem finamente reguladas, neste trabalho realizamos ensaios biofísicos com o objetivo de propor possíveis mecanismos regulatórios da GlnE a nível molecular., pois são importantes para aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo de nitrogênio em bactérias, bem como para contribuir para o desenvolvimento de futuros biofertilizantes. Para isso, tanto a GlnE nativa quanto às variantes truncadas GlnE3-6 e GlnE1-2 foram analisadas por Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)para verificar a influência da temperatura em agregados proteicos. O Dicroísmo Circular (DC) foi realizado para determinar a estrutura proteica. E, para avaliar a ligação de ATP e glutamina ao domínio ATase da GlnE, a Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF) foi realizada com a GlnE3-6. Como resultados, a GlnE1-2 parece estar em um estado de agregados de diferentes tamanhos. Os resultados de (DC) sugerem que a GlnE sofreu uma perda significativa da estrutura secundária quando aquecida, enquanto GlnE3-6 e GlnE1-2 não. No DSF foi observado que, primeiro, o ATP deve se ligar ao sítio catalítico da GlnE, seguido da interação com glutamina. Com isso, conclui-se que a concentração de ATP na célula bacteriana pode ser significativa para a regulação do metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae*.

INTRODUÇÃO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria que coloniza raízes de gramíneas, promovendo o crescimento vegetal. Em bactérias, a amônia (NH_3) obtida por fixação de nitrogênio é assimilada pela Glutamina sintetase (GS) com consumo ATP. A atividade da GS é ajustada de forma rápida e reversível por modificação pós-traducional: adenililação e desadenililação (CHUBATSU et al., 2012).

Um mecanismo catalisado pela enzima bifuncional GlnE (AR/ATase). Em *H. seropedicae*, evidências indicam que a adenililação da GS é estimulada pela glutamina (BENELLI et al., 1997). Essa regulação, ainda, não foi descrita em nível

estrutural. Por isso, o objetivo foi caracterizar a GlnE e as variantes GlnE1-2 e Gln3-6 de *H. seropedicae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Bactéria e vetores, Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), Dicroísmo Circular (DC) e Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF)

As bactérias *Escherichia coli* BL21 e TOP foram utilizadas para replicar e expressar, respectivamente, os plasmídeos: *glnEpETm11* (Tomazini, L. F. et al., 2025), *glnE12pET28a* (Stefanello, A. A. et al. (não publicado)) e *glnE36pET28a* (Stefanello, A. A. et al. (não publicado)).

Para a técnica de DLS, as proteínas foram incubadas a 50°C por 10 minutos. A dispersividade foi medida pelo Litesizer 500 (Anton Paar). Os valores teóricos do raio hidrodinâmico foram obtidos pela plataforma HullRad.

No DC, as proteínas aquecidas e não aquecidas foram diluídas em água destilada para uma concentração final de 0,5 mg/mL. As medidas de CD foram realizadas pelo Jasco J-810, a 20°C. A elipticidade foi normalizada pela concentração molar das proteínas e conversão dos valores para elipticidade molar.

No DSF, as reações com a GlnE 3-6 foram feitas no termociclador de RT-PCR StepOne (Applied Biosystems), entre 25 a 94°C, variando 1°C por minuto, e a emissão de fluorescência foi gerada pelo StepOne v2.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

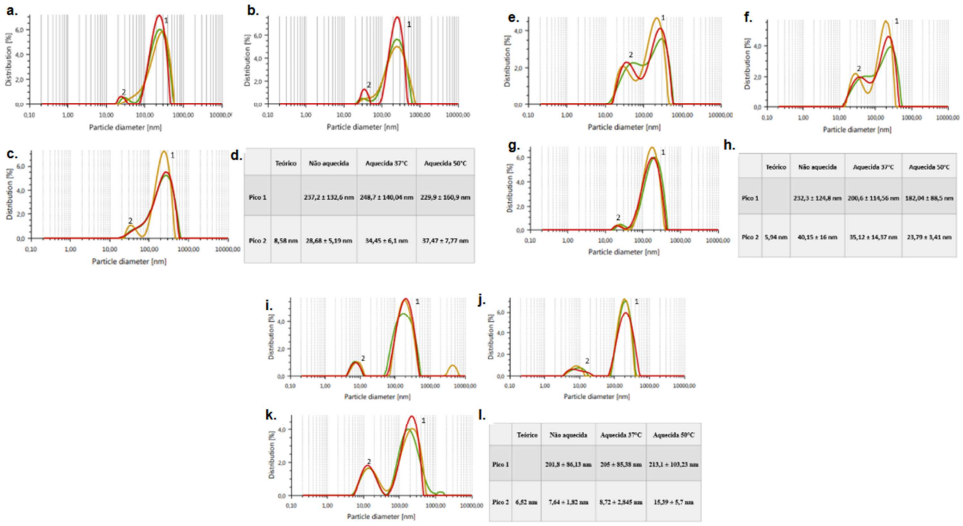
Para DLS, a Figura 1, a., b. e c., ressalta que GlnE, GlnE1-2 e GlnE3-6 purificadas não estavam monodispersas, mas tiveram comportamento polidisperso (presença de agregados). Para GlnE inteira vemos um: 1) pico 1 com valores de diâmetros hidrodinâmicos superiores a 230 nm (agregados proteicos); e, 2) pico 2, com valores na faixa de 28 e 37 nm referentes à fração não agregada e funcional da proteína. Isso sugere que a proteína está na forma de pequenos agregados.

Na Figura 1, e., f. e g., mostra picos menos definidos e sobrepostos para GlnE1-2, que indica distribuição de diferentes tamanhos de agregados coexistindo. O pico 2 mostrou valores elevados (até 40 nm), porque pode conter agregação proteica e indicar baixa estabilidade dessa variante.

Para GlnE3-6, a Figura 1, i., j. e k., demonstra um pico 2 com valores próximos ao diâmetro hidrodinâmico teórico esperado (~6 nm) na condição não aquecida (7,64 nm), possivelmente, porque uma pequena fração da proteína estava na sua forma monomérica e funcional. Isso sugere maior estabilidade estrutural da GlnE3-6 em comparação com a GlnE inteira e com GlnE1-2.

Para a GlnE inteira, houve aumento no diâmetro hidrodinâmico do pico 2, (desnaturação parcial). Para a GlnE1-2, uma redução no tamanho dos dois picos foi vista, porém o pico 2 permanece bem acima do valor teórico estimado, isto é, o calor apenas desdobrou agregados maiores em agregados menores. Para a GlnE 3-6, o aquecimento promoveu aumento de duas vezes no diâmetro do pico 2,

possivelmente, porque ocorreu uma desassociação de agregado induzido por calor sem perder completamente a estrutura.



	Teórico	Não aquecida	Aquecida 37°C	Aquecida 50°C
Pico 1		237,2 ± 132,6 nm	248,7 ± 140,04 nm	229,9 ± 160,9 nm
Pico 2	8,58 nm	28,68 ± 5,19 nm	34,45 ± 6,1 nm	57,47 ± 7,77 nm

	Teórico	Não aquecida	Aquecida 37°C	Aquecida 50°C
Pico 1		232,3 ± 124,8 nm	200,6 ± 114,56 nm	182,04 ± 88,5 nm
Pico 2	5,94 nm	40,15 ± 16 nm	35,12 ± 14,37 nm	23,79 ± 3,41 nm

	Teórico	Não aquecida	Aquecida 37°C	Aquecida 50°C
Pico 1		201,8 ± 86,13 nm	205 ± 85,38 nm	213,1 ± 103,23 nm
Pico 2	6,82 nm	7,64 ± 1,82 nm	8,72 ± 2,845 nm	15,39 ± 8,7 nm

Figura 1. DLS da GlnE nativa de *H. seropedicae* não aquecida, **a.**, aquecida a 37ºC, **b.**, aquecida a 50ºC, **c.** e, valor de diâmetro hidrodinâmico teórico, e médias experimentais de cada pico e seus respectivos desvios padrão, **d.**. DLS da GlnE1-2 não aquecida, **e.**, aquecida a 37ºC **f.** aquecida a 50ºC **g.** valor de diâmetro hidrodinâmico teórico e médias experimentais de cada pico e seus respectivos desvios padrão **h.**. DLS de GlnE 3-6 não aquecida **i.**, aquecida a 37ºC **j.,** aquecida a 50ºC **k.** diâmetro hidrodinâmico teórico e médias experimentais de cada pico e seus respectivos desvios padrão **l.**. Cada linha dos gráficos representa uma leitura da triplicata (média de 10 acumulações).

No DC, as proteínas não aquecidas apresentaram espectro de DC de proteínas ricas em α-hélices. O padrão de sinal de CD sugere que as proteínas tinham estrutura secundária (Figura 2 A, B, C). A comparação entre os espectros de CD entre proteínas não aquecidas e aquecidas indicou que a GlnE aquecida a 50°C apresentou acentuada redução no sinal de CD, indicando perda da estrutura secundária e sensibilidade ao aquecimento a 50°C (Figura 2A). O aquecimento das GlnE1-2 e GlnE3-6 promoveu pouca variação na intensidade do sinal de elipticidade molar ou no padrão de absorção, um indício de que mantiveram a organização do seu dobramento (Figura 2 B, C).

Os valores de elipticidade molar para GlnE e GlnE3-6 nas condições não aquecidas variaram entre -10.000 e 20.000 deg.cm^2.dmol^{-1}. GlnE1-2 apresentou elipticidade molar entre 7.500 e -2.500 deg.cm^2.dmol^{-1}, que pode sugerir uma menor densidade de estrutura secundária na GlnE1-2. As amostras aquecidas a 50°C, indicam que a GlnE apresentou perda de estrutura secundária em comparação com a GlnE1-2, que apresentou uma pequena variação e a GlnE3-6 que se manteve praticamente invariável (Figura 2 A, B, C).

Para a DSF,Figura 2 D, a titulação da glutamina não produziu a estabilização térmica da GlnE3-6 (vermelho). Já, a titulação do ATP teve um aumento no valor de ΔT_M (verde). A titulação de glutamina com a GlnE3-6 com ATP 5 mM produziu uma variação positiva e linear na temperatura de melting. Nessa condição tanto a interação da glutamina (roxo), quanto a baixa afinidade pode ter sido estabilizadas. Sendo possível que a ligação de glutamina precise da presença prévia de ATP.

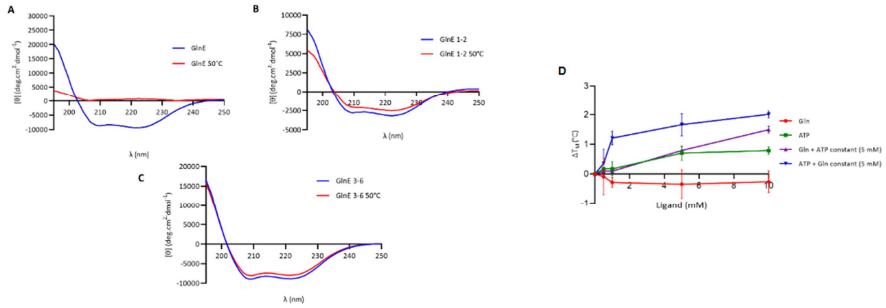


Figura 2. Espectros de DC para GlnE **(A)**, GlnE1-2 **(B)** e GlnE3-6 **(C)**, nas condições não aquecida (linha azul) e aquecida a 50°C (linha vermelha). Os espectros mostram a elipticidade molar (em deg·cm²·dmol⁻ ¹) em função do comprimento de onda (nm), refletindo alterações na estrutura secundária das proteínas. **(D)** DSF de ATP e glutamina com a GlnE3-6 por DSF. As linhas indicam a variação na temperatura de melting (ΔT_M) da titulação de ATP (verde), glutamina (vermelho), ATP com glutamina constante em 5mM (azul) e glutamina com ATP constante em 5mM (roxa).

A titulação de ATP com a GlnE3-6 incubada com glutamina 5 mM teve uma variação positiva na temperatura de melting (azul). Isso indica que a presença da glutamina aumenta consideravelmente a interação do ATP com a GlnE3-6.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o ATP deve interagir com GlnE primeiro para que depois disso a glutamina possa se ligar à GlnE. Uma vez que a glutamina interagiu com a GlnE, a afinidade desta pelo ATP pode aumentar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq, à UEM e ao Laboratório de Bioquímica de Procariotos.

REFERÊNCIAS

BENELLI, E. M. et al. Evidence for two possible glnB-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 14, p. 4623-4626, jul. 1997. Disponível em: https://doi.org/10.1128/jb.179.14.4623-4626.1997. Acesso em: 20 jul. 2026.

CHUBATSU, L. S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, p. 197-207, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11104-011-0819-6. Acesso em: 23 ago. 2026.

TOMAZINI, L. F. et al. Modulation of Glutamine Synthetase adenylylation by nitrogen availability enables one-step purification in distinct post-translational states. **Protein Expression and Purification**, v. 235, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pep.2025.106779. Acesso em: 22 jul. 2026.