

AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE EM *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

Larissa Fonseca Tomazini (PIBIC/CNPq), Marco Aurélio Schuler de Oliveira
(Orientador), e-mail: masoliveira2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Bioquímica/Maringá,
PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq: 2.08.02.00-5 (Bioquímica de microrganismos)

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, glutamina sintetase, Sistema Ntr.

Resumo:

A enzima glutamina sintetase (GS) é responsável pela assimilação no nitrogênio fixado, um processo fortemente regulado. O presente trabalho tem como objetivo expressar e purificar a enzima GS de *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria diazotrófica endofítica, com o objetivo de caracterizá-la *in vitro*. O mecanismo de regulação da enzima GS de *H. seropedicae* ainda é desconhecido, mas parece envolver de alguma forma a enzima GlnE, que adenilila GS, e as proteínas do tipo PII. O conhecimento do mecanismo de regulação da atividade de GS de *H. seropedicae* poderá sugerir formas de manipular geneticamente a bactéria com o objetivo de gerar estirpes capazes de fixação de nitrogênio de forma constitutiva e, conseqüentemente, de excretar amônio. O objetivo do presente projeto foi de amplificar o gene *glnA*, que codifica a enzima GS, de *H. seropedicae*, clonar o gene amplificado em vetor de expressão e verificar a superexpressão da proteína. Os resultados obtidos permitirão a purificação da enzima GS, que será utilizada para ensaios de caracterização *in vitro*, levando a um entendimento refinado do mecanismo de regulação da assimilação de nitrogênio em *H. seropedicae* e em outras bactérias.

Introdução

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio que coloniza tecidos internos de gramíneas (Baldani et al, 1984). *H. seropedicae* contribui para o crescimento da planta, através da produção de fitohormônios e da incorporação de nitrogênio fixado a sua biomassa. Esses fatores fazem com que *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante, sendo uma alternativa mais eficiente e menos poluente que os fertilizantes nitrogenados.

A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio, o qual é combinado com o esqueleto carbônico do 2-OG para formar glutamina e glutamato (Merrick e Edwards, 1995). Esses aminoácidos, por sua vez, servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas.

A via mais utilizada para a assimilação do amônio envolve as enzimas Glutamina Sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Nessa via, a GS catalisa a aaminação do glutamato à glutamina, a qual tem seu grupo amida transferido para o 2-OG pela enzima (GOGAT) para formar duas moléculas de glutamato.

A taxa catalítica de GS é regulada via transdução de sinal, a qual determina o estado de modificação covalente da proteína. Em altos níveis de nitrogênio, GS é adenililada por GlnE, o que em enterobactérias causa uma diminuição da atividade de GS. Por outro lado, quando a concentração de nitrogênio fixado diminui, GlnE retira os grupamentos adenilil de GS, dando origem a uma forma mais ativa da enzima. Em *H. seropedicae*, através de um estudo proteômico, três diferentes formas de GS foram identificadas em gel 2D, indicando uma possível modificação pós-traducional não convencional nessa proteína além da adenililação (Huergo et al, 2010).

Em *H. seropedicae* ainda não está claro o papel do sistema Ntr na regulação da atividade de GS. Diversos pontos ainda precisam ser esclarecidos, especialmente aqueles que relacionam regulação da atividade com a modificação pós-traducional de GS, e ainda como esses fatores se relacionam com o sistema Ntr.

Materiais e métodos

Meios de Cultura e Condições de Cultivo

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C no meio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al, 1989) e o meio sólido foi Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook et al, 1989).

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP-malato líquido, a 30° C, sob agitação a 130 rpm, por 24 horas. No momento do inóculo foram adicionados 50 mmol/L de solução de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L; KH₂PO₄ 159,5 g/L), e 20mmol/L de cloreto de amônio. Os meios NFbHP sólido e semi-sólido possuem ágar (15g/L e 1,75 g/L, respectivamente).

Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes

As amostras proteicas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo glicina (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). As proteínas foram visualizadas após a coloração por Coomassie Blue.

Manipulação do DNA

As reações de ligação, restrição e PCR foram realizadas em condições específicas para a atividade máxima de cada enzima, de acordo com orientação do fabricante.

A purificação de plasmídeos foi realizada através do método de lise alcalina (Sambrook et al, 1989). Plasmídeos, produtos de PCR e fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, conforme descrito por Sambrook et al (1989).

Resultados e Discussão

Inicialmente o DNA genômico da estirpe SmRI de *H. seropedicae* foi extraído e utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando primers específicos para amplificar o gene *glnA* dessa bactéria. Após a realização da PCR, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 1).

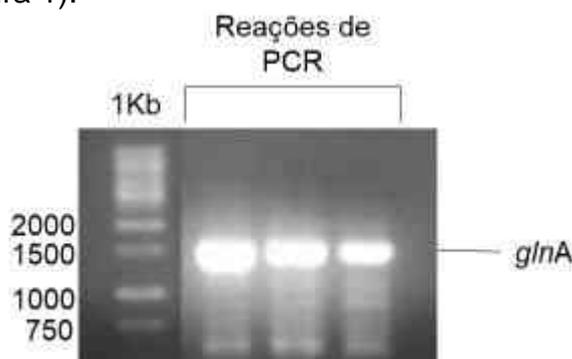


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV. A primeira coluna contém o marcador 1 Kb ladder (Fermentas®) e nas posteriores o Gene *glnA* amplificado.

O fragmento amplificado foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, cujo sítio de reconhecimento foi adicionado nos primers. O gene foi então clonado no vetor pET29a digerido com as mesmas enzimas, formando um plasmídeo recombinante. A clonagem foi confirmada através da digestão com enzimas de restrição dos prováveis clones, conforme demonstra a figura 2.

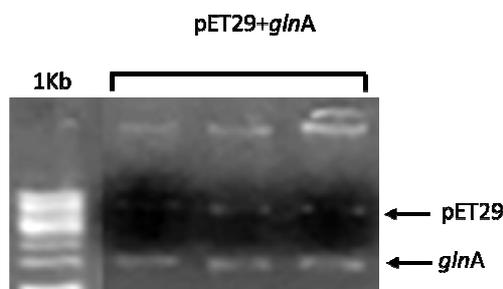


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1% da reação da confirmação dos clones em pET29a. O gel foram corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador UV. Os clones foram cortados com *XbaI* e *XhoI*. A primeira coluna contém o marcador 1 Kb ladder (Fermentas®) e nas posteriores a digestão do clone *glnA*:pET29a.

O plasmídeo recombinante foi então transformado em *E. coli* BL21(DE3), estirpe utilizada para supressão de proteínas codificadas por genes com transcrição sob controle do promotor T7. A indução da expressão de GS foi feita pela adição de IPTG a culturas em estado exponencial de crescimento. As proteínas da célula superexpressando GS foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE (Figura 3).

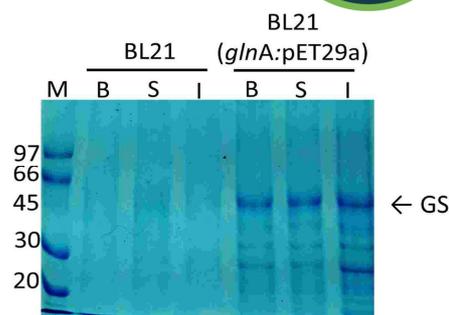


Figura 3 - Eletroforese em gel de poli-acrilamida 12% dos extratos proteicos da estirpe BL21 de *E. coli* sem nenhum plasmídeo ou com o plasmídeo *glnA:pET29a*. As proteínas foram coradas com azul de coomassie. A primeira coluna contém o marcador de massa LWM (GE Lifesciences®). A posição da proteína GS (52 KDa) está indicada.

Conclusões

O gene *glnA* de *H. seropedicae* foi amplificado com primers específicos e clonado em vetores de expressão. O plasmídeo recombinante construído dessa forma, foi utilizado para superexpressão da proteína GS em sistema heterólogo.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq, UEM, Laboratório de Bioquímica Molecular (DBQ), FINEP.

Referências

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J.A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 56, p.365, 1984.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol.Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.

HUERGO, L.F.; NOINDORF, L.; GIMENES, C.; LEMGRUBER, R.S.P.;CORDELINI, D.F.; FALARZ, J.; CRUZ, L.M.; MONTEIRO, R.A.; PEDORA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, 308, 40-47, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

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