

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA GlnE (ATase) DE *Herbaspirillum seropedicae*

Julia Bandeira Urbano (PIBIC/CNPq), Marco Aurélio Schuler de Oliveira
(Orientador), e-mail: marco.aso@gmail.com.

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

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#):
2.08.00.00-2 – Bioquímica, 2.08.02.00-5 – Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, glutamina sintetase, enzima
GlnE

Resumo:

A *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria que coloniza tecidos internos de gramíneas e tem capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico. O nitrogênio fixado por essa bactéria é incorporado à biomassa da planta hospedeira. Além disso, *H. seropedicae* também pode induzir o crescimento da planta pela produção de fitohormônios, dessa forma, possuindo alto potencial para substituir a fertilização nitrogenada, que é mais cara e agressiva ao meio ambiente. A enzima glutamina sintetase (GS) é responsável pela assimilação do nitrogênio fixado. O mecanismo de regulação da enzima GS de *H. seropedicae* ainda é desconhecido, mas parece envolver a enzima GlnE, que adenilila GS, e as proteínas do tipo PII, GlnB e GlnK. 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. Anteriormente, o gene *glnA* de *H. seropedicae*, que codifica a enzima GS, foi amplificado e clonado em vetor de expressão. O objetivo do presente projeto é clonar o gene que codifica a enzima GlnE e superexpressar a mesma em sistema heterólogo. Com as enzimas GS e GlnE purificadas, futuramente serão realizados 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 capaz de colonizar os tecidos internos de gramíneas com interesse econômico, sem causar qualquer dano aparente ao hospedeiro (Baldani et al, 1986). *H. seropedicae* realiza a fixação biológica de nitrogênio, e o nitrogênio fixado pela bactéria é incorporado à biomassa da planta hospedeira. Por isso, tem 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 (2-oxoglutarato) para formar glutamina e glutamato (Merrick e Edwards, 1995). Esses aminoácidos, por sua vez, servem como doadores de grupos amino para reações biossintéticas. O primeiro passo na assimilação do amônio é catalisado pela enzima glutamina sintetase (GS), no qual o glutamato é aminado à glutamina.

A glutamina sintetase bacteriana, codificada pelo gene *glnA*, sofre uma forte regulação, de forma a atender as necessidades metabólicas da célula naquele momento. Um dos níveis de regulação da enzima é modificação covalente: uma adenililação reversível do resíduo de tirosina 397 (van Heeswijk, 2013). Essa alteração é realizada em altos níveis de nitrogênio pela enzima GlnE, ou adenililtransferase (ATase). A modificação causa uma diminuição da atividade catalítica da enzima (Nelson e Cox, 2014).

Em nosso grupo de pesquisa, o gene que codifica a GS de *H. seropedicae* já foi clonado e a proteína superexpressa e purificada. O presente trabalho pretende clonar o gene que codifica a enzima GlnE, superexpressar e purificar a proteína, para que sua atividade *in vitro* seja caracterizado. A proteína produzida dessa forma terá sua regulação determinada por trabalhos futuros.

Materiais e métodos

Meios de Cultura e Condições de Cultivo

Para transformação, foi adicionado DNA plasmidial ao tubo de células competentes e cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al, 1989), com a presença de antibiótico. As estirpes de *Escherichia coli* foram em seguida cultivadas em meio sólido Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook et al, 1989), a 37°C.

Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% (m/v), segundo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados com tampão TBE e a corrida eletroforética realizada no mesmo tampão. A corrida foi realizada entre 40 a 60 V (aproximadamente 5V/cm de gel). O DNA foi visualizado, após tratamento do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em transiluminador de luz ultravioleta.

Superexpressão de GlnE

Algumas colônias da placa BL21 GlnE foram cultivadas durante a noite em meio líquido LB. No dia seguinte, foram preparados os inóculos e a superexpressão foi induzida com a adição de IPTG 0,5 mM durante o crescimento.

Eletrforese de proteínas em condições desnaturantes

As amostras proteicas obtidas foram submetidas a eletrforese em gel de poliacrilamida 12% contendo glicina (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Após a coloração por Coomassie Blue, as proteínas presentes foram observadas.

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 *glnE* dessa bactéria. Após a realização da PCR, os produtos da reação foram analisados por eletrforese em gel de agarose 1% (Figura 1).

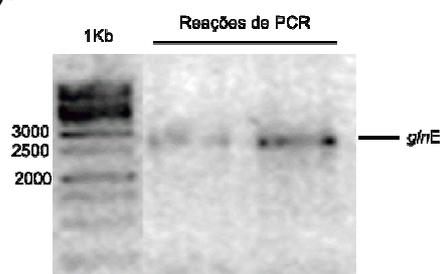


Figura 1 - Eletrforese em gel de agarose 1% da reação de PCR. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV. A primeira coluna contém o marcador 1 Kb ladder (Fermentas®) e nas posteriores o gene *glnE* amplificado.

O fragmento amplificado foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, 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.

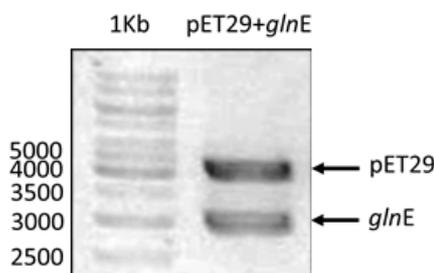


Figura 2 - Confirmação da clonagem do gene *glnE* no vetor pET29a.

O plasmídeo recombinante foi então transformado em *E. coli* BL21. Foi realizada a indução da superexpressão da proteína GlnE adicionando IPTG 0,5 mM durante o crescimento exponencial. A expressão da proteína foi analisada em gel de acrilamida 12% contendo SDS-PAGE (Figura 3).

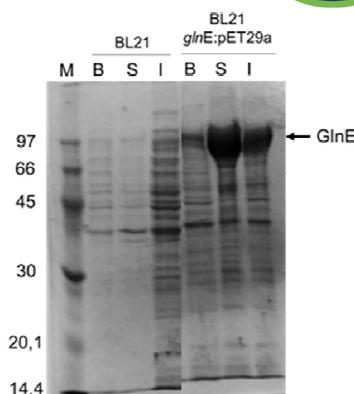


Figura 3 – SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos da estirpe BL21 de *E. coli* sem nenhum plasmídeo, com o plasmídeo *glnE:pET29a*, conforme indicação na figura.

É possível observar a superexpressão da proteína em comparação à BL21 vazia. Porém a maior concentração da proteína encontra-se no extrato bruto e, a maior parte, na fração insolúvel da amostra. Os próximos passos do trabalho são aumentar a solubilidade da proteína para então purificá-la.

Conclusões

O gene *glnE* da bactéria *H. seropedicae* foi amplificado e clonado em vetor de expressão. A proteína recombinante GlnE foi superexpressa no sistema heterólogo testado.

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.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.
- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol.Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.
- NELSON, D.L., COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 6. ed. São Paulo: **Artmed**, p. 889, 2014.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- van HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; BOOGERD, F.C. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, p. 628-695, 2013.