

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

Amanda Ruoso Lazzari Almeida (PIBIC/FA), Marco Aurelio Schüler de Oliveira (Orientador), e-mail: marco.aso@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / 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: Fixação de nitrogênio; via biossintética; via γ -glutamil transferase

Resumo

A principal fonte de nitrogênio para a maioria das bactérias é o amônio. A assimilação dessa molécula consiste na sua condensação com o esqueleto carbônico do 2-oxoglutarato (2-OG) para formar glutamato e glutamina. A via mais importante de assimilação de amônio possui duas enzimas: glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Na primeira etapa dessa via, GS catalisa a condensação do amônio à uma molécula de glutamato para formar glutamina. O fluxo metabólico através dessa via é fortemente regulado, sendo GS o principal alvo de regulação. Recentemente, no nosso laboratório o gene que codifica a enzima GS de *Herbaspirillum seropedicae* foi amplificado e clonado em vetor de expressão. O presente trabalho tem como objetivos a superexpressão da proteína GS em sistema heterólogo, a posterior purificação da mesma por cromatografia de afinidade e a verificação de sua atividade *in vitro*.

Introdução

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa, capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano ao hospedeiro. Evidências apontam que o nitrogênio fixado por esse organismo é incorporado na biomassa da planta hospedeira (Pankievicz et al, 2015). Esses fatores fazem com que *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante.

As bactérias preferem utilizar o amônio como fonte de nitrogênio, o qual é combinado com 2-OG (2-oxoglutarato) para formar glutamina e glutamato (Merrick e Edwards, 1995). Estes são aminoácidos doadores de nitrogênio para reações biossintéticas, portanto importantes no metabolismo das bactérias.

A assimilação do amônio pode ocorrer pela via glutamina sintetase (GS) em que o glutamato é aminado à glutamina que tem seu grupo amida transferido para o 2-OG pela glutamato sintase (GOGAT) formando duas moléculas de glutamato.

A glutamina sintetase bacteriana, codificada pelo gene *glnA*, sofre uma forte regulação de acordo com as necessidades metabólicas da célula e a sua atividade

pode ser avaliada por meio de duas reações distintas catalisadas por ela: a biossintética e a γ -glutamil transferase.

A atividade de GS pode ser regulada por adenililação reversível que consiste na ligação covalente de moléculas de AMP à um resíduo de tirosina, causando uma diminuição da atividade catalítica da enzima.

Em nosso grupo de pesquisa, o gene *glnA* de *H. seropedicae* já foi clonado, a proteína superexpressa e purificada com o objetivo de sugerir alvos para mutação, gerando estirpes super-fixadoras de nitrogênio. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi purificar a proteína superexpressa e estabelecer ensaios *in vitro* para determinação de sua atividade. A proteína produzida dessa forma terá sua regulação determinada por trabalhos futuros.

Materiais e métodos

Eletroforese de proteínas

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.

Superexpressão e purificação de proteínas

A estirpe BL21 de *E. coli* transformada com o plasmídeo para superexpressão de GS foi inoculada em meio LB, e as células crescidas até DO_{600} em torno de 0,5. Para induzir a expressão adicionou-se 0,5 mM de IPTG e após a indução, os *pellets* das células foram ressuspensos em Tampão A (Tris-HCl pH 8,0 50mM, NaCl 100mM, Imidazol 20mM e glicerol 10%) e rompidas no sonicador. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi purificado por cromatografia de afinidade.

Atividades biossintética e transferásica

Para descrever ambas as atividades foram feitas reações com diferentes concentrações de GS e com o volume final de 70 μ L. Para a biossintética as reações continham imidazol (57mM), hidroxilamina (28 mM), $MgCl_2$ (34,3 mM) e glutamato (97,14 mM). Para a atividade γ -GT foi utilizado nas reações imidazol (77,14 mM), hidroxilamina (11,4 mM), $MnCl_2$ (0,17 mM), Arsiniato de Potássio (14,3 mM) e ADP (0,23 mM). A biossintética foi disparada adicionando 10 μ L de ATP, enquanto a γ -GT foi disparada com 10 μ L de glutamina. Ambas foram incubadas a 37°C por 60 minutos e paradas com adição de Stop Mix ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,04M, TCA 0,12 M e HCl 0,61 M). Os microtubos foram centrifugados, 100 μ L do sobrenadante transferidos para placa de 96 poços a fim de realizar leitura da absorbância a 540 nm no equipamento Flex Station 3. Foi construída uma curva de tempo para a concentração de GS de 200 nM, sendo parada a reação nos tempos 0, 2, 5, 10, 30 e 60 minutos.

Resultados e Discussão

Após a transformação dos plasmídeos em BL21 a enzima glutamina sintetase foi superexpressa e purificada na coluna de níquel.

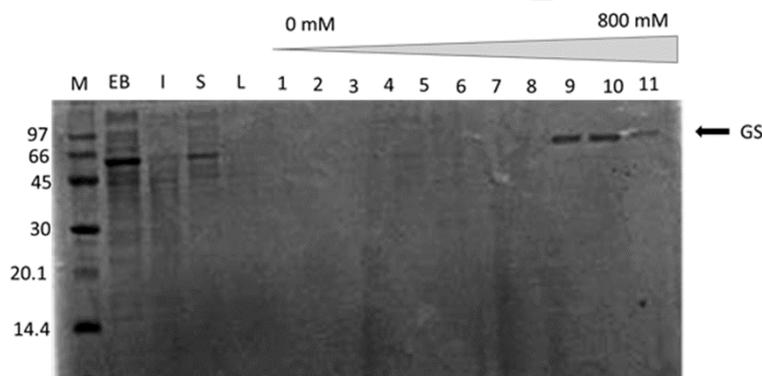


Figura 1 – SDS-PAGE para purificação da glutamina sintetase de *H. seropedicae*. O lane (M) contém o marcador de massa molecular LWM (GE Lifesciences®). As frações: Extrato bruto (EB); Insolúvel (I); Solúvel (S); Ligado (L); As frações enumeradas foram eluídas com gradiente de imidazol conforme indicado.

O tamanho da enzima no SDS-PAGE foi cerca de 52 KDa, que corresponde ao tamanho molecular da glutamina sintetase. Após a purificação a proteína foi dialisada contra solução tampão (Tris 50 mM; NaCl 50 mM). E então a GS teve sua concentração determinada pelo Nanodrop 2000 que foi de 5 mg/mL de dodecâmetro para GS.

A proteína GS purificada foi submetida à testes para analisarmos sua atividade, para isso verificou-se sua concentração adequada testando as concentrações de 10, 50, 200, 500 e 1000 nM de GS.

A GS foi purificada na sua forma ativa, em que a atividade foi observada mesmo em baixas concentrações e foi possível observar que houve maior atividade na reação transferase do que na biossintética.

Para verificar o melhor tempo da atividade de GS foi observada a formação de produtos pelas reações catalisadas por ela por uma hora.

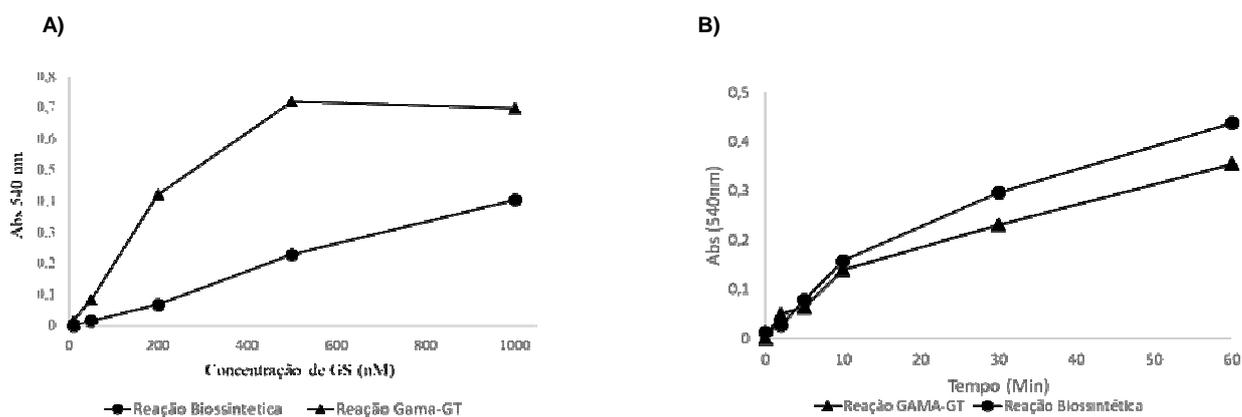


Figura 2. A) Teste de atividade realizado em diferentes concentrações da enzima glutamina sintetase na reação biossintética e na reação γ -GT. **B)** Teste de atividade da GS 200 nM em uma hora.

Em diversos ensaios de caracterização a atividade da enzima demonstrou que a forma adenilada da enzima tem a sua atividade γ -GT inibida por íons Mg^{+2} . Essa

metodologia foi empregada para identificar o grau de adenililação da GS purificada (Figura 3).

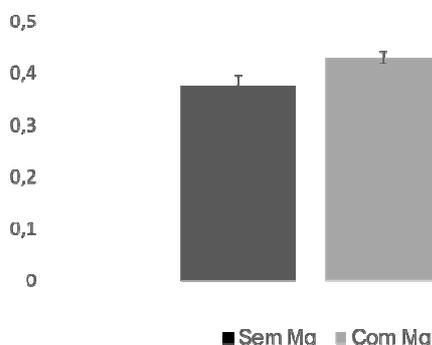


Figura 3 – Determinação do grau de adenililação da GS.

A comparação da atividade transferásica da GS na presença ou não de íons Mg^{+2} indica que não houve inibição aparente da enzima.

A partir da fórmula de Stadtman e colaboradores (1979) conclui-se que o grau de adenililação da enzima purificada nesse trabalho foi de 0,5%, ou seja, praticamente não houve modificações.

Conclusões

O gene *glnA* codificante da GS foi amplificado, clonado e as proteínas purificadas por cromatografia de afinidade. A enzima GS foi purificada e sua atividade foi verificada através das reações biossintéticas e γ -glutamil transferase. A GS encontrou-se não adenililada.

Agradecimentos

PIBIC/FA, UEM, Laboratório de Bioquímica de Procaríotos (DBQ).

Referências

- 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.
- PANKIEVICZ, V.C.; do AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.; AGTUCA, B.; SCHUELLER, M.J.; ARISI, A.C.; STEFFENS, M.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; STACEY, G.; FERRIERI, R.A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant J.**, v. 81, p. 907-19, 2015.
- STADTMAN, E.R.; SMYRNIOTIS, P.Z.; DAVIS, J.N & WITTENBERGER, M.E. Enzymatic procedures for determining the average state of adenylation of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Anal Biochem.**, v. 95 p. 275–285, 1979.