

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA VARIANTE TRUNCADA DA PROTEÍNA GLNE DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

Eduardo Sabatine Lopes (PIBIC/CNPq), Marco Aurelio Schüler de Oliveira
(Orientador), e-mail: marco.aso@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / 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: Glutamina Sintetase; ATase; Fixação de Nitrogênio

Resumo:

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria que coloniza tecidos internos de gramíneas com interesse econômico e é capaz de fixar nitrogênio, o qual é incorporado à biomassa da planta. Assim, apresenta potencial para ser utilizado como biofertilizante. A assimilação de amônio em bactérias envolve a enzima Glutamina Sintetase (GS), que catalisa a conversão de amônia e glutamato em glutamina. A atividade de GS é fortemente regulada pela adenililação reversível de GS. Tanto a adição quanto a remoção de AMP de GS são catalisadas pela enzima bifuncional GlnE (ATase), que possui 3 domínios estrutural e funcionalmente distintos: um domínio N-terminal com atividade de desadenililação, um domínio central com atividade regulatória, e um domínio C-terminal com atividade de adenilil-transferase. No entanto, o exato mecanismo de regulação de GlnE ainda não é conhecido. Dessa forma, este projeto teve por objetivo isolar um domínio de GlnE de *H. seropedicae* para uma futura caracterização *in vitro*. Para isso, foram clonados os plasmídeos contendo genes que codificam o domínio Central+C-terminal. Após a clonagem, os plasmídeos foram transformados na estirpe BL21 de *Escherichia coli* para a superexpressão das proteínas recombinantes. A expressão foi induzida pela adição do indutor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), visto que os genes estavam sob controle promotor T7 regulado por LacI. As bactérias foram lisadas em sonificador, e a solubilidade das proteínas verificada por SDS-PAGE. A purificação da variante Central+C-terminal foi conduzida por cromatografia em coluna de níquel. A concentração da proteína purificada é de 2,982 mg/mL. Os próximos passos envolvem experimentos para caracterização da variante.

Introdução

O nitrogênio é um elemento limitante do crescimento vegetal, entretanto plantas não conseguem assimilar diretamente o nitrogênio molecular (N_2) da atmosfera, tornando necessária a utilização de fertilizantes industriais para produção em larga escala, que causam impactos ambientais. Os procariotos chamados diazotrofos podem fixar nitrogênio reduzindo nitrogênio molecular atmosférico à amônio. Além disso, podem estabelecer relações ecológicas com plantas, de forma que o nitrogênio fixado por

eles pode ser assimilado e incorporado a biomassa da planta, promovendo o crescimento vegetal. A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é um diazotrofo endofítico que foi isolado da rizosfera e superfície de plantas como milho, arroz e sorgo e posteriormente descrita colonizando bananeira e abacaxizeiro. Evidências mostram que plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram aumentos no peso seco (22% a 50%), conteúdo total de carbono (15% a 50%) e no conteúdo total de nitrogênio (29% a 85%) em 30 dias, mostrando que esse organismo se apresenta com um potencial biofertilizante (GYANESHWAR et al, 2002).

Em bactérias, a fonte primária de nitrogênio é o amônio. Uma das vias de assimilação de amônio é a via da enzima Glutamina Sintetase (GS) que catalisa a aminação de glutamato à glutamina, um processo regulado pela adenililação reversível de GS pela enzima bifuncional GlnE. Em enterobactérias, altos níveis de nitrogênio fixado promovem a formação de um complexo de GlnE com a enzima GlnB livre e glutamina, catalisando a adenililação de GS, que leva a sua inativação. Nesses organismos, em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a GS é ativada por desadenilação também catalisada pela GlnE complexada a GlnB uridililada (ARCONDÉGUY et al, 2001).

A enzima GlnE é formada por 946 aminoácidos e que possui 3 domínios funcional e estruturalmente distintos. O domínio N-terminal ativa a GS ao remover o grupo adenilil de GS (atividade adenilil removedora – AR) O domínio C-terminal inativa a GS pela transferência de adenilil (atividade adenilil transferase – AT). Entre esses dois domínios existe ainda o domínio regulatório (R), que é capaz de ligar a proteína regulatória GlnB (JIANG & NINFA, 2009; CLANCY et al, 2009). Em *H. seropedicae*, no entanto, existem diversas evidências indicando que o modelo de regulação de GS parece ser diferente em vários aspectos do descrito para *E. coli* e diversos pontos ainda precisam ser esclarecidos, especialmente aqueles que relacionam a regulação da atividade com a modificação pós-traducional de GS, e ainda como esses fatores se relacionam com o sistema Ntr.

Anteriormente, em nosso laboratório, foram construídos plasmídeos de expressão contendo genes que codificam para versões truncadas correspondentes aos domínios isolados da proteína GlnE fusionados à cauda de histidinas (dados não publicados). Uma dessas construções é bastante útil para estudar a regulação exercida pelo domínio regulatório: a que possui deleção do domínio AR, possuindo apenas os domínios R e AT (GlnE Δ AR). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi expressar e purificar a variante truncada GlnE Δ AR da proteína GlnE de *Herbaspirillum seropedicae* a fim de caracterizar *in vitro* o papel dessa proteína na regulação de GS.

Materiais e métodos

Inicialmente, foram transformadas, por choque térmico, células de *E. coli* Top10 com o plasmídeo recombinante *glnE Δ ARpET28a* que possui gene de resistência a canamicina (Km). As células foram cultivadas em meio LA (ágar bacteriológico 15 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L e Triptona 5 g/L) contendo Km para a seleção de colônias transformadas. Os plasmídeos foram extraídos das células

transformadas pelo método de extração por lise alcalina e transformados na estirpe BL21(DE3), também de *E. coli*, para a superexpressão de proteínas.

A superexpressão de proteínas foi conduzida em meio líquido LB (NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L e Triptona 5 g/L). As células foram mantidas sob agitação a 37°C até atingir DO_{600} em torno de 0,5 e, então, a expressão proteica foi induzida pela adição de IPTG (0,5 mM) por 3 horas. As células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Os *pellets* de células foram ressuspensos em Tampão A (Tris pH 8,0 50mM; NaCl 50mM e Imidazol 20mM) e rompidas por sonicação.

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade. Para tanto, a fração solúvel foi injetada em uma coluna Hi-Trap-Chelating- Ni_2^+ . A resina foi preparada seguindo especificações do fabricante e equilibrada em tampão A (Tris-HCl pH 8,0 50mM, NaCl 100mM, Imidazol 20mM e glicerol 10%). A separação foi realizada em cromatógrafo Äkta Basic (GE Healthcare) e verificada em SDS-PAGE.

A proteína foi dialisada em tampão de diálise (NaCl 50mM e Tris pH 8,0 50mM) sob agitação por cerca de 16h. Após esse período, a diálise prosseguiu em um segundo tampão (NaCl 50 mM; Tris pH 8,0 e Glicerol 50%) por mais 4 h. As proteínas foram dosadas por espectrofotometria em Nanodrop (Thermo Scientific) pela absorbância em 280nm.

Resultados e Discussão

A indução por IPTG é bastante eficiente para a expressão da proteína GlnE, isso pode ser observado na grande quantidade de GlnE na fração correspondente ao extrato bruto, em contraste com as proteínas não superexpressas (Figura 1). Além disso, GlnE é uma proteína pouco solúvel em soluções aquosas, prejudicando a purificação, que utiliza água como solvente. A insolubilidade pode ser verificada na eletroforese da fração insolúvel, mostrada na figura 1.

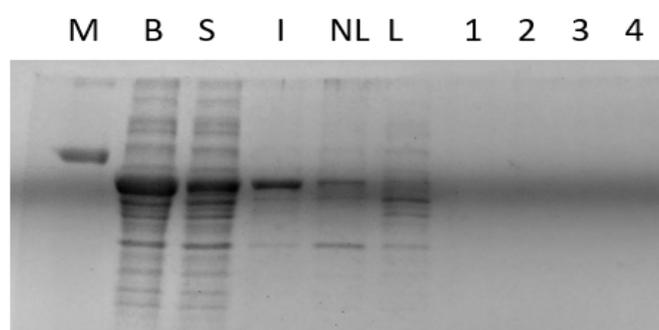


Figura 1. SDS-PAGE para purificação da variante GlnE Δ AR. O marcador (M) utilizado foi BSA. As frações: Bruto (B); Solúvel (S); Insolúvel (I); Não Ligado (NL); Ligado (L); Frações 1, 2, 3 e 4

A figura 2 mostra que foi possível purificar a proteína, que apresenta peso molecular de 54kDa.

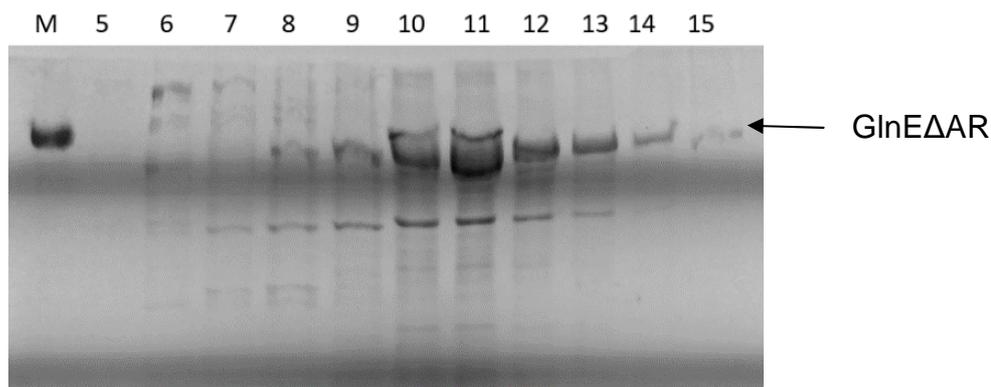


Figura 2. SDS-PAGE para purificação de GlnE Δ AR. O marcador (M) utilizado foi BSA. As amostras são nas frações 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. É possível observar GlnE Δ AR nas frações 10, 11 e 12.

A quantificação da proteína em Nanodrop a 280 nm indica uma concentração de 2,982 mg/mL

Conclusões

A variante truncada GlnE Δ AR da proteína GlnE, clonada no vetor pET28a, foi expressa pela indução do IPTG e purificada. Os próximos passos envolvem a utilização da variante purificada em experimentos de caracterização da atividade dos domínios central e AT na regulação de GS.

Agradecimentos

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

Referências

- ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Sinal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.
- CLANCY, P.; XU, Y.; van HEESWIJK, W.C.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain. **FEBS J.**, v.274, p.2865-2877, 2007
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum-tolerant rice varieties. **New Phytol.**, v. 154, p. 131-145, 2002.
- JIANG, P.; NINFA, A.J. Reconstitution of *Escherichia coli* glutamine synthetase adenylyltransferase from N-terminal and C-terminal fragments of the enzyme. **Biochemistry**, v.48, p.415-423, 2009.