

## PRODUÇÃO DE UMA VARIANTE DA PROTEÍNA GS DE *Herbaspirillum seropedicae* CONTENDO A MUTAÇÃO G130S

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

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

### Ciências Biológicas II - Bioquímica de Microrganismos

**Palavras-chave:** Fixação de nitrogênio, proteína recombinante, mutantes excretores.

#### Resumo:

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio que coloniza tecidos internos de plantas e é capaz de estimular o crescimento do hospedeiro. Dentre as plantas com as quais se associa, incluem-se gramíneas com grande interesse econômico. Por isso, *H. seropedicae* tem um grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante. A enzima glutamina sintetase (GS), codificada pelo gene *glnA*, é responsável pela assimilação do nitrogênio fixado, um processo fortemente regulado, mas ainda não conhecido totalmente em *H. seropedicae*. A atividade de GS é altamente regulada em estirpes selvagens por quatro vias, sendo uma delas o excesso de amônio no ambiente. Trabalhos anteriores mostraram que mutantes espontâneos de *A. brasilense* foram capazes de fixar nitrogênio, sem ocorrer inibição por altas concentrações de amônio. Este fenótipo tem sido atribuído a mutações no gene *glnA*. O objetivo do presente projeto foi construir uma variante mutante do gene *glnA* de *H. seropedicae* utilizando a técnica de mutação sítio-dirigida, afim de codificar a enzima GS com a mutação G130S e cloná-lo em vetor de expressão. O gene contendo a mutação desejada foi construído e clonado em vetor de expressão com sucesso. Na continuidade do trabalho a proteína mutante será superexpressa e purificada para que sua atividade seja caracterizada.

#### Introdução

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é diazotrófica endofítica. Dentre as plantas com as quais se associa, incluem-se gramíneas com interesse econômico, como cana de açúcar, trigo e milho. O nitrogênio fixado por essa bactéria é incorporado à biomassa da planta hospedeira. Além de não causar danos, *H. seropedicae* pode induzir o crescimento da planta pela produção de fitohormônios (Bastian et al, 1998). Dessa forma, essa bactéria tem alto potencial para substituir a fertilização nitrogenada, que é mais cara e mais agressiva ao meio ambiente. A enzima glutamina sintetase (GS) é

responsável pela assimilação do nitrogênio fixado, um processo fortemente regulado, porém esse mecanismo ainda é desconhecido na *H. seropedicae*. Em estudos anteriores, foram encontradas estirpes mutantes da bactéria *Azospirillum brasilense* capazes de excretar amônio e fixar nitrogênio constitutivamente, não sendo inibidas por altas concentrações de amônio, como a estirpe selvagem (Machado et al, 1991). Esses e outros fenótipos encontrados nas estirpes mutantes têm sido atribuídos a mutações pontuais no gene *glnA*, que codifica a enzima GS, ou em sua região promotora, entre elas a mutação G130S. Esses resultados sugerem que 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 fixar nitrogênio de forma constitutiva e, conseqüentemente, excretar amônio. O objetivo do presente projeto foi construir uma variante mutante do gene *glnA* *H. seropedicae* de forma que codificasse a enzima GS contendo a mutação G130S e clonar o gene mutante em vetor de expressão.

## Materiais e métodos

### *Estratégia para construção do mutante*

Para a construção da variante gênica com mutação pontual G130S foi utilizada a mutação sítio-dirigida. Primers complementares à uma região do gene *glnA* de *H. seropedicae* contendo um erro de pareamento, que introduzem a mutação desejada, foram desenhados. O gene a ser mutagenizado foi amplificado com dois conjuntos de primers separadamente: um primer complementar a região 5' com um primer mutagênico 3' (fragmento *up*) e um primer mutagênico 5' com um primer 3' (fragmento *down*). Os primers mutagênicos são complementares entre si, assim os fragmentos *up* e *down* foram misturados e usados como molde para uma nova reação de PCR, chamada de *overlapping*, usando os primers não mutagênicos. O produto desse segundo ciclo contém a mutação desejada.

### *Eletroforese de DNA*

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose 1% (m/v). Os géis foram preparados com tampão TBE e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão. A corrida foi feita entre 40 a 60 V, durante o tempo necessário para a separação desejada das bandas.

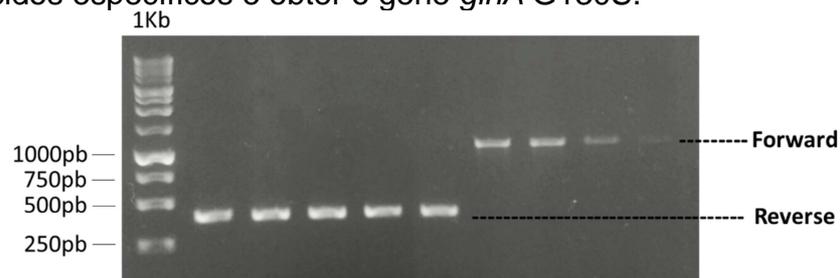
### *Clonagem do DNA*

O vetor de expressão escolhido para a clonagem do gene mutante amplificado foi o pET28a (Novagen), o qual permite a superexpressão do gene clonado a partir de um promotor T7 e adiciona uma cauda de histidinas N-terminal na proteína recombinante. Para facilitar a clonagem os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* foram adicionados flanqueando o gene mutante amplificado. Essas enzimas foram escolhidas

porque também digerem o sítio de policlonagem do referido vetor. Tanto o gene amplificado quanto o vetor foram então digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI* (Thermo Fisher Scientific) seguindo orientações do fabricante. Após confirmação da digestão por eletroforese em gel de agarose, as enzimas de restrição foram inativadas por calor (20 minutos a 80°C). A ligação do gene ao vetor, ambos devidamente digeridos, foi realizada através da catálise da enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific), seguindo orientações do fabricante, e a ligação então foi transformada em *E. coli* TOP10. As colônias transformantes foram crescidas em meio líquido, tiveram seu DNA plasmidial extraído e a confirmação foi feita também por digestão com endonucleases de restrição. Foram escolhidas as enzimas *XbaI* e *XhoI*, que liberam o inserto clonado somado a um fragmento de 97 pb do vetor. O produto dessa digestão foi corrido em eletroforese em gel de agarose para a determinação do padrão de bandas resultante.

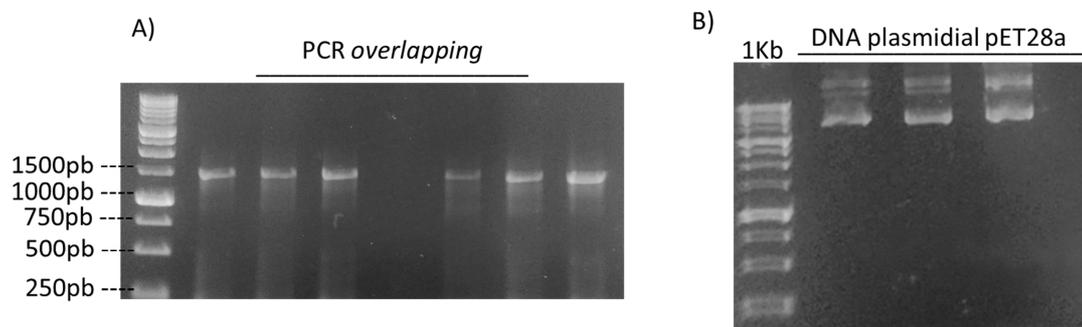
## Resultados e Discussão

A estratégia de mutagênese sítio-dirigida foi utilizada para substituir os aminoácidos específicos e obter o gene *glnA* G130S.



**Figura 1** - Eletroforese das reações de PCR. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador UV.

O tamanho dos fragmentos *up* e *down* que aparecem no gel são correspondentes com o tamanho esperado, sendo 1042 pb e 395 pb, respectivamente. Em seguida foi realizada a PCR *overlapping*, a transformação e lise celular para liberação do plasmídeo pET28a.



**Figura 2** – A) Eletroforese das reações de PCR *overlapping*. B) Eletroforese de DNA plasmidial do pET28a. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador UV.

O tamanho do fragmento desejado da reação de PCR *overlapping* é de 1437 pb, portanto o resultado mostrado na figura 2A indica o sucesso dessa reação. O plasmídeo pET28a tem 5369pb. Esse plasmídeo e o fragmento gênico a ser clonado foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, com a subsequente ligação e transformação em *E. coli*. Os transformantes foram coletados, o DNA plasmidial extraído e a confirmação da clonagem feita mediante a digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*. O resultado dessa digestão está mostrado na figura 3, que confirma o sucesso da clonagem. Esses clones agora serão transformados na estirpe BL21(DE3) de *E. coli* para superexpressão da proteína, para posterior purificação e caracterização *in vitro*.



Figura 3 - Eletroforese para confirmação de clonagem.

## Conclusões

O gene *glnA* de *H. seropedicae* codificante de GS, amplificado em trabalhos anteriores, foi mutagenizado utilizando a mutagênese sítio-dirigida e clonado em TOP10 *E. coli*. Esses clones agora serão transformados na estirpe BL21(DE3) para superexpressão da proteína, para posterior purificação e caracterização *in vitro*.

## Agradecimentos

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

## Referências

BÁSTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.** v. 24, p. 7-11, 1998.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 549-553, 1991.