QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VIVO* DAS ISOFORMAS DA ENZIMA ASPARAGINA SINTETASE DE *Herbaspirillum seropedicae*

Maria Luiza Soares da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Milena Eloísa Ribeiro (Coautora), Amanda Ruoso Almeida Lazzari (Coautor), Marco Aurelio Schuler de Oliveira (Orientador). E-mail: ra132312@uem.br.

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

Área de conhecimento: Ciências Biológicas/Bioquímica/Bioquímica de Microorganismos.

Palavras-chave: Assimilação de amônio; Metabolismo de nitrogênio; Biofertilizante.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio capaz de colonizar os tecidos internos de plantas e apresenta potencial uso como biofertilizante a fim de aumentar o crescimento vegetal. Estudos mostram que perturbações das vias de assimilação de amônio podem gerar estirpes superfixadoras de nitrogênio. Recentemente, foram descobertos quatro genes codificadores da Asparagina sintetase no genoma da bactéria *H. seropedicae*. O padrão de expressão dessas enzimas foi estudado por qPCR, indicando uma regulação pelos níveis de nitrogênio fixado no meio de cultura. Para melhor caracterização dessas enzimas, o presente trabalho quantificou suas atividades *in vivo*. As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malatocom alto ou baixo nitrogênio.Os aminoácidos glutamato, aspartato e asparagina foram quantificados nos extratos de *H. seropedicae*utilizando a técnica de HPLC (High Performance LiquidCromatography). Os resultados indicaram que o aminoácido glutamato tem sua concentração intracelular muito aumentada quando a bactéria é cultivada em alto amônio. Os níveis de asparagina sintetase foram baixos, indicando uma baixa atividade das isoformas da Asparagina sintetase *in vivo*. Em baixo nitrogênio, a Asparagina sintetase foi capaz de assimilar amônio.

INTRODUÇÃO

Herbaspirillum seropedicae é uma β-Proteobacteria gram-negativa capaz de colonizar os tecidos internos das plantas sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (Baldani et al., 1986). Ela faz fixação de nitrogênio: converte o nitrogênio

atmosférico em moléculas reativas disponíveis para outros seres vivos. A atividade de fixação de nitrogênio tem grande importância para a agricultura, já que o esse elemento é um fator limitante para a produtividade das culturas agrícolas. O uso de fertilizantes químicos causa danos ambientais, pois aumentam as emissões de óxido de nitrogênio, a acidificação do solo, eutrofização de rios e a produção industrial de amônia para esse fim é cara e energicamente intensiva (Dixon e Kahn, 2004).
O desenvolvimento de inoculantes comerciais exige um aumentona capacidade de promoção de crescimento vegetal. Uma forma de alcançar esse objetivo é manipular seu metabolismo de modo a gerar estirpes com maior capacidade de fixação de nitrogênio. Dentre as vias cuja perturbação pode gerar estirpes superfixadoras são as de assimilação de amônio. Em *H. seropedicae* a reação de assimilação de amônio melhor caracterizada é aquela catalisada pela enzima Glutamina sintetase (GS). Entretanto, outras possíveis vias de assimilação ainda não foram estudadas nessa bactéria, uma possibilidade de assimilação de amônio, descrita até o momento, apenas em enterobactérias, é através da enzima Asparagina Sintetase.
Recentemente, buscas no genoma da estirpe SmRI de *H. seropedicae* utilizando ferramentas de bioinformática indicaram a presença de quatro diferentes genes codificantes de isoformas da Asparagina sintetase, todas do tipo B, nomeadas AnsB1 a AnsB4. O padrão de expressão dessas enzimas já foi estudado por qPCR, indicando uma regulação pelos níveis de nitrogênio fixado no meio de cultura. Para melhor caracterização dessas enzimas, se faz necessário quantificar suas atividades *in vivo*, o objetivo do presente trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Crescimento bacteriano
As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato.No momento do uso, foi adicionada ao uma fonte de nitrogênio conforme detalhado em cada experimento. Duas condições de nitrogênio diferentes foram utilizadas: 20 mM de NH_4Cl para a condição de alto nitrogênio disponível, nomeada neste trabalho como S20. E utilizou-se 5 mM de glutamato para a condição limitante de nitrogênio, nomeada neste trabalho como S5.

Dosagem de aminoácidos
Os extratos celulares foram obtidos de 3 mL de meio NFb-malatocultivados em suas respectivas condições de nitrogênio. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em KCl 1% e então lisadas por sonicação.Para a dosagem dos aminoácidos, foi utilizada uma alíquota de cada extrato, a qual foi submetida a uma reação de derivatização com O-ftaldialdeído (Benson e Hare, 1975).

A solução resultante foi injetada em um cromatógrafo líquido. Os aminoácidos foram separados usando uma Coluna C_{18} de fase reversa. O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação em 265 nm e emissão em 480 nm e o resultado foi dado em µmol/100 µL de extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da quantificação de aminoácidos de bactérias cultivadas em alto ou baixo nitrogênio está mostrado na Figura 1.

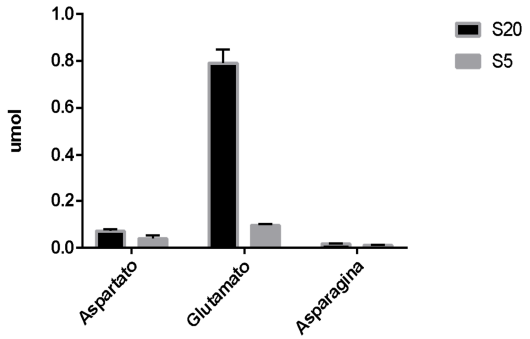

Figura 1 - Quantificação *in vivo* de aminoácidos**.**

A figura 1 mostra que o glutamato está presente em grande quantidade no extrato na condição S20. Possivelmente, a baixa concentração intracelular de glutamato encontrada na condição S5 se deve à alta atividade de GS nessas condições, que consome o *pool* de glutamato para formar glutamina. Em altas concentrações de amônio (S20), com uma menor atividade de GS, o *pool* de glutamato fica protegido da atividade de GS e se acumula.

Devido à dificuldade em detectar a Asparagina nos extratos intracelulares (Figura 1), decidiu-se verificar a atividade imediata das Asparagina sintetases dos extratos celulares. Para isso, foi misturado o aminoácido aspartato com amônio ou glutamina, na presença de ATP, e verificou-se a formação de asparagina após a adição de extratos bacterianos S5 ou S20. Os resultados são mostrados na figura 2.

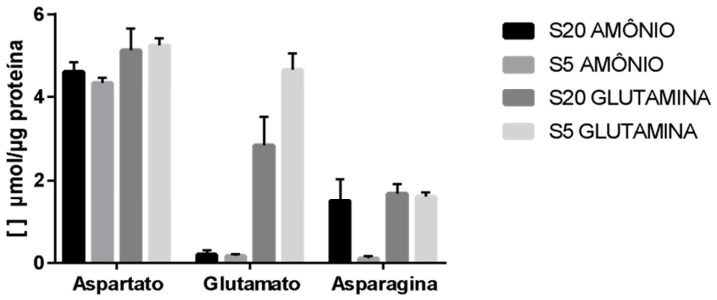

Figura 2 - Atividade das isoformas de Asparagina sintetase B no extrato bruto de *H. seropedicae*.

Asparaginas sintetases em contato com aspartato e amônio podem realizar a assimilação do nitrogênio, e o resultado da figura 2 nos mostra que só houve assimilação na condição de alto nitrogênio.

CONCLUSÕES

O Glutamato se acumula no citosol de *H. seropedicae* crescida em alto nitrogênio e em baixo nitrogênio a Asparagina sintetase desse organismo foi capaz de assimilar amônio.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES e Laboratório de Bioquímica de Procariotos.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bacteriol.**,v. 36, p. 86-93, 1986.

BENSON, J. R., HARE, P. E., O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA 72:619–622, 1975.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**,v. 2, p. 621-631, 2004.