XXX Encontro Anual de Iniciação Científica
VII Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
eaic 2021

PURIFICAÇÃO E TESTE DE ATIVIDADE DA VARIANTE MUTANTE G130S DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae*

Gabriel Machado de Freitas (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Amanda Ruoso Lazzari Almeida, Ana Paula Alves dos Santos Silva, Marco Aurelio Schuler de Oliveira. e-mail: masoliveira2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Bioquímica

Área e subárea do conhecimento: 2.08.02.00-5 Bioquímica dos Microorganismos
Palavras-Chave*: Herbaspirillum seropedicae*, Glutamina sintetase, assimilação de amônio, fixação de nitrogênio

Resumo

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio. Em estudos anteriores, mutações na enzima Glutamina Sintetase (GS) foram associadas ao fenótipo de fixação de nitrogênio constitutiva, entre elas, as mutações G130S e L293R. Os genes que codificam para essas enzimas mutantes foram clonados em vetor de expressão em trabalhos prévios. No presente projeto, não foi possível observar expressão do clone contendo o gene que codifica a enzima GS G130S, frustrando um dos objetivos do trabalho. No entanto, a proteína com a mutação L293R foi superexpressa, purificada e sua atividade testada.

Introdução

A fixação do Nitrogênio consiste na redução do nitrogênio atmosférico a amônio, tornando-o disponível para outros seres vivos. *H. seropedicae* é uma bactéria capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano ao hospedeiro (Baldani et al, 1986).

Em um trabalho de seleção de mutantes com bactéria *A. brasilense*, foram encontradas 4 estirpes mutantes capazes de fixar nitrogênio constitutivamente (Machado et al, 1991). Esse fenótipo tem sido atribuído a mutações pontuais no gene que codifica a enzima GS, entre elas, as mutações G130S e L293R. O presente trabalho teve como objetivo produzir variantes da GS recombinante de *H. seropedicae* com essas mutações e testar suas atividades.

Material e Métodos

Plasmídeos de expressão contendo os genes que codificam as variantes da proteína GS do trabalho (glnAG130SpETM11 e glnAL293RpETM11) foram transformados na estirpe BL21(DE3) de *E. coli*. A superexpressão das proteínas fusionadas com His-tag foi induzida por IPTG. O extrato proteico contendo a proteína superexpressa foi injetado em uma coluna de cromatografia de níquel e eluídas com imidazol. A proteína purificada teve sua atividade testada nas reações biossintética e γ-glutamil transferase (γ-GT) conforme descrito anteriormente (Bender et al, 1977).

Resultados e Discussão

Os resultados indicaram que a proteína G130S não foi superexpressa (dados não mostrados). A hipótese mais provável é que o plasmídeo tenha algum problema na construção, e a clonagem precisará ser refeita.

A falha na expressão da proteína mutante G130S nos incentivou a fazer a superexpressão da proteína mutante L293R. Essa proteína foi surperexpressa e purificada (Figura 1).

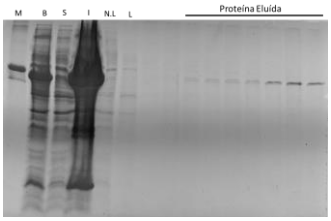


Figura 1. SDS-PAGE da proteína GS L293R purificada

Com a variante G130S, a atividade foi verificada pela atividade biossintética e pela atividade γ-GT com e sem íons Mg^{2+}, o que permite inferir o estado de modificação pós-traducional da enzima.

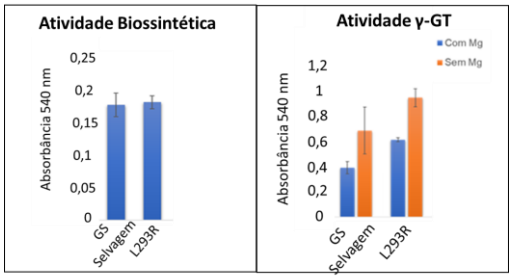


Figura 2. Atividade da enzima GS L293R purificada

Conclusão

A proteína mutante GS 130S não foi superexpressa. nem purificada. A variante L293R foi superexpressa, purificada e sua atividade testada. A enzima apresentou atividade biossintética e γ-glutamil transferase semelhantes à selvagem, indicando que está no mesmo estado de modificação pós-traducional.

Agradecimentos

UEM, CNPq, CAPES, FINEP e UEPG

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.

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.

Bender, R.A., Janssen, K.A. Resnick, A.D., Blumenberg, M., Foor, F. Magasanik, B. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*, J**. Bacteriol.** 129 1001–1009, 1977.

Universidade Estadual de Ponta Grossa
ISSN 1676-0093
propesp PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO