

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE AQUAPORINAS DE SOJA (*Glycine max*) E SEU PAPEL NO TRANSPORTE DE UREIA

Bruna Nitzke Minuzzi, Fernanda Staniscuaski

Introdução

Aquaporinas (AQPs) são proteínas de membrana conhecidas como canais de água. Estudos comprovaram que além de transportar água, AQPs também fazem o transporte de pequenos solutos, como ureia, ácido bórico, ácido silícico, amônia e dióxido de carbono. A regulação e a função destas proteínas estão associadas com as respostas fisiológicas aos sinais ambientais que geram desequilíbrio do balanço de água e íons. Em plantas, AQPs também participam de outros processos, como a nutrição mineral. Estão divididas em 5 subfamílias: proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas de tonoplastos (TIPs), proteínas tipo nodulina-26 (NIPs), proteínas intrínsecas pequenas (SIPs) e proteínas intrínsecas X (XIPs). Em soja (*Glycine max*), foram encontradas 66 genes de aquaporinas em seu genoma.

A ureia é um fertilizante nitrogenado de alta produção e consumo no Brasil. As plantas apresentam baixa eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados, gerando um alto custo no cultivo, além de problemas de contaminação do solo. Um entendimento sobre os transportadores de ureia é de grande importância para uma possível melhora no uso deste fertilizante pelas plantas.

O projeto tem como objetivo principal caracterizar funcionalmente as aquaporinas de soja em relação às moléculas transportadas por estas proteínas, com ênfase no transporte de ureia.

Material e Métodos

Os genes de interesse foram amplificados por PCR, utilizando-se primers específicos desenhados a partir das sequências depositadas no banco de dados Phytozome.

Os produtos da PCR foram clonados no vetor pGEM T-Easy (Promega) e esta construção foi utilizada para transformação de *Escherichia coli*. Após confirmação da identidade dos genes por sequenciamento, os genes de interesse foram removidos do vetor pGEM T-Easy, utilizando-se as enzimas de restrição NotI e XhoI. Os genes foram então subclonados no plasmídeo pYES2 (Invitrogen) o qual contém o gene *ura3* como marca de seleção. Esta construção foi utilizada para transformação, por choque térmico, de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) competentes. Os transformantes foram selecionados em meio sem uracila.

Os ensaios de complementação funcional em leveduras foram realizados conforme Liu et al. (2003). Duas linhagens de *S. cerevisiae* foram utilizadas: YLLO43W (com deleção no gene de AQP Fsp1) e YHLo16C (com deleção no gene transportador de ureia DUR3). Ambas possuem o genótipo $\Delta ura3$, onde não há o crescimento em meio deficiente em uracila. As linhagens foram cultivadas em meio sintético completo (SC) suplementado com rafinose a 30 °C por 48 h. A absorbância da cultura (600 nm) foi ajustada para 0,5 e quatro diluições seriadas foram plaqueadas em meio SC suplementado com galactose e complementado com as moléculas de interesse de estudo. As placas foram incubadas por 3 a 5 dias a 30 °C para acompanhamento do crescimento das colônias.

Resultados

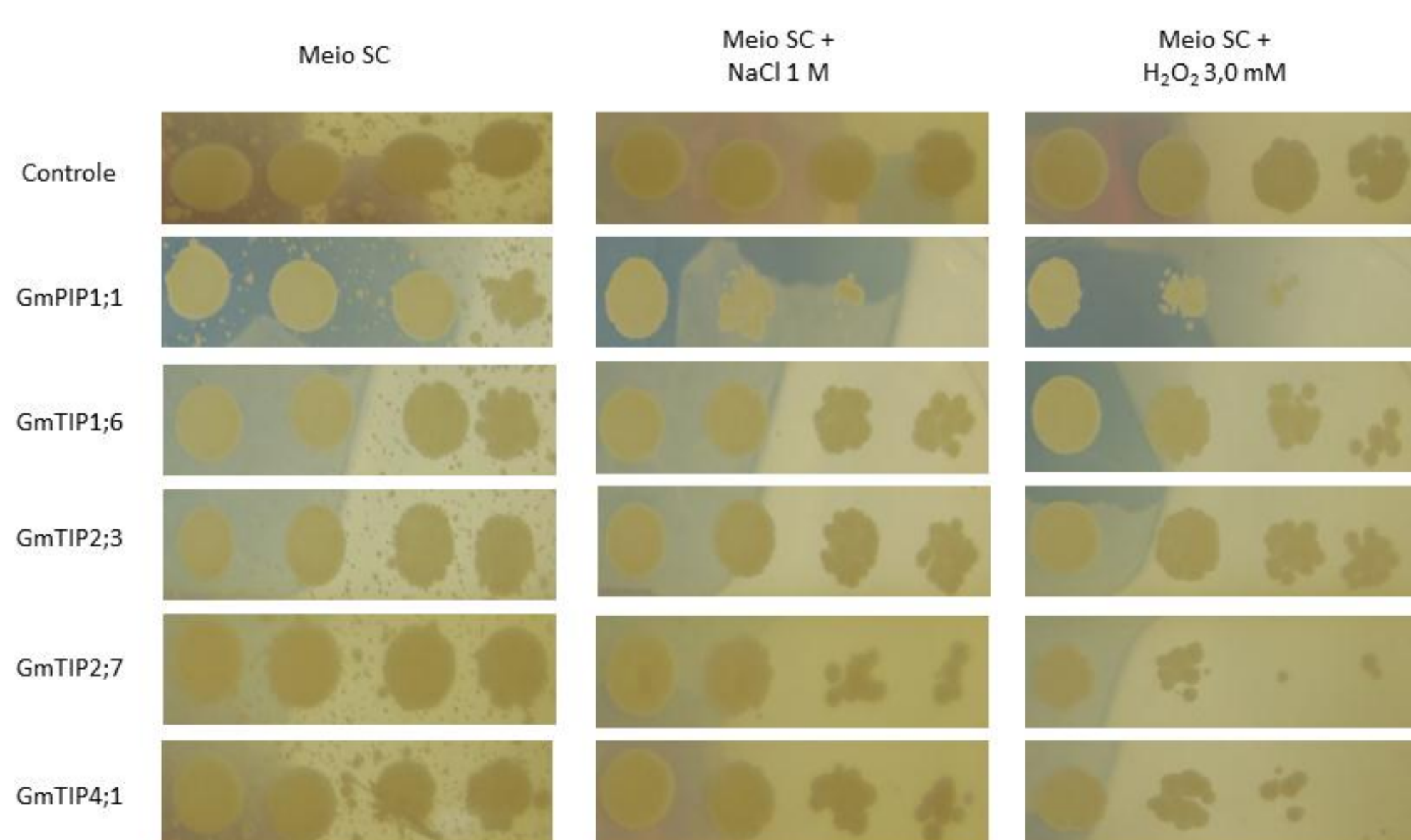


Figura 1. Ensaio de complementação funcional. *S. cerevisiae* expressando as aquaporinas de soja transformadas com o pYES2 vazio (controle), as quais foram cultivadas overnight em meio líquido. Diluições seriadas das culturas de células (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) foram plaqueadas em meio sólido suplementado com NaCl 1 M ou H₂O₂. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 - 5 dias.

Conclusão

Os resultados preliminares indicam que as todas AQPs testadas formam canais funcionais, além de serem transportadoras de peróxido de hidrogênio. Ensaio para verificação do transporte de ureia por estas proteínas estão em andamento.