

## Clonagem do gene *glnR* de *Paenibacillus riograndensis* em vetores plasmidiais

Eliara Assis Mauzolf<sup>1,3</sup> Luciane Passaglia<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

<sup>2</sup> Orientadora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

<sup>3</sup> Núcleo de Microbiologia Agrícola – NMA, Departamento de Genética, UFRGS

### INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento essencial para os seres vivos. A atmosfera é composta em abundância por N<sub>2</sub>, porém, organismos mais complexos não conseguem assimilar essa molécula (Howard JB, 1996). Um dos métodos utilizados para reduzir N<sub>2</sub> atmosférico à amônia, sem causar danos ao ambiente, é através da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esse processo é realizado por micro-organismos diazotróficos, portadores da enzima nitrogenase, que tornam o nitrogênio metabolicamente utilizável por outros seres vivos. Esse processo é altamente energético para as células e finamente regulado pela disponibilidade de nitrogênio e níveis de oxigênio (Huergo *et al.*, 2009).

O mecanismo de regulação de genes relacionados com o processo de FBN está bem caracterizado em modelos Gram-negativos, mas são pouco compreendidos em bactérias Gram-positivas (Cheng Q., 2008). Os poucos exemplos estudados dentro de bactérias Gram-positivas mostram modelos regulatórios completamente distintos, incluindo promotores dependentes de  $\sigma^{70}$  e pouco conhecimento sobre os seus elementos regulatórios básicos (Enkh-Amgalan *et al.*, 2006). O promotor dependente de  $\sigma^{70}$  é diferente dos típicos promotores dependentes de  $\sigma^{54}$  -24/-12 encontrados a montante dos genes *nif* em bactérias fixadoras de nitrogênio Gram-negativas. Ao contrário de diazotróficas Gram-negativas, em Gram-positivas não existe o ativador transcricional NifA, nem o sítio de ligação de NifA na região promotora do cluster dos genes *nif*. No modelo Gram-positivo *Bacillus subtilis* dois fatores transcricionais, TnrA e GlnR, controlam a expressão dos genes *nif* em resposta à disponibilidade de nitrogênio (Kormelink *et al.*, 2012).

Nosso modelo de estudo é a bactéria *Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>, Gram-positiva, diazotrófica aeróbia facultativa e formadora de esporos. Ela foi isolada da rizosfera de trigo e seu genoma possui três agrupamentos de genes relacionados ao processo de FBN, sendo dois sistemas funcionais, *nif* e *anf* (Fernandes *et al.*, 2014). Caracterizar a função da proteína GlnR contribui para o entendimento da regulação da expressão dos genes *nif* e do mecanismo de FBN em *P. riograndensis*.

### OBJETIVO

- 1) Obter o gene *glnR* a partir do genoma de *P. riograndensis* pela reação de PCR e construir o plasmídeo pGEM::*glnR*.
- 2) Confirmar a inserção do gene *glnR* no vetor pGEM-T Easy pelo método de sequenciamento.
- 3) Construir o plasmídeo pGEX::*glnR* para posterior purificação da proteína de fusão.

### METODOLOGIA

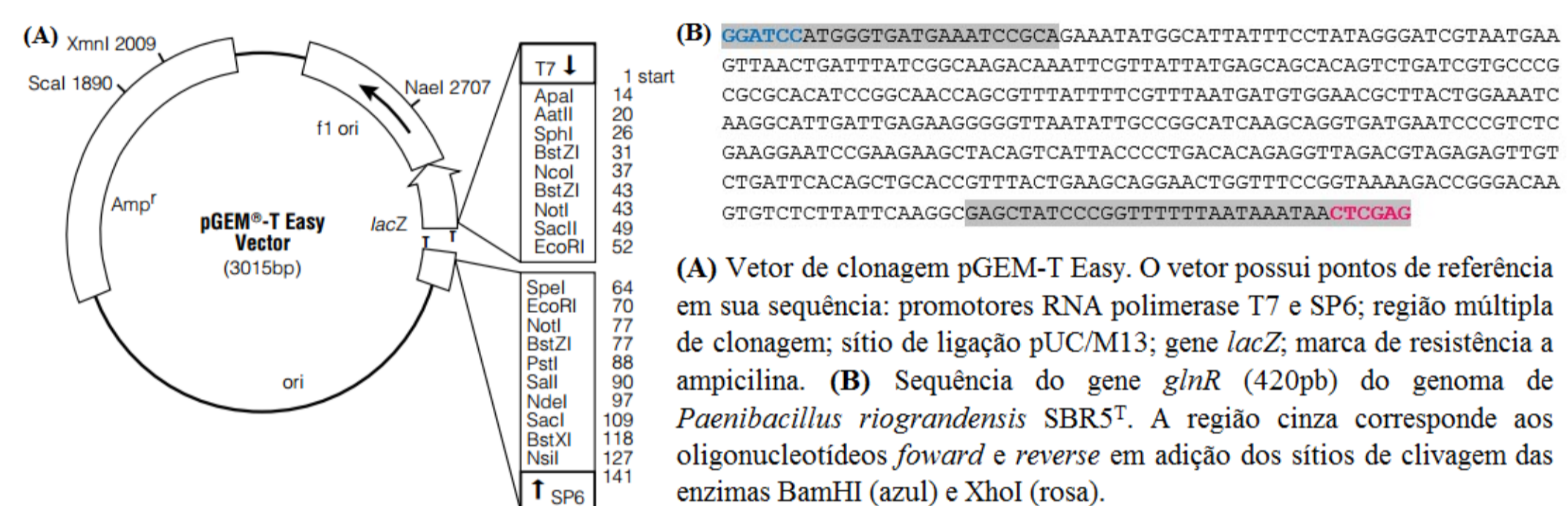
1) Clonagem do gene *glnR* para obtenção do plasmídeo pGEM::*glnR*: realizamos uma reação de PCR a partir do genoma de *P. riograndensis* SBR5<sup>T</sup> para obtenção do gene *glnR* (420 pb). Os oligonucleotídeos foram construídos com sequências adicionais dos sítios das enzimas BamHI e XhoI para posterior digestão. Uma reação de ligação com o produto da PCR e o vetor pGEM-T Easy foi realizada e essa foi transformada em células termocompetentes de *Escherichia coli* para a obtenção de plasmídeos recombinantes.

2) Confirmação dos transformantes com inserção do gene *glnR* pelo método de Sanger: colônias recombinantes foram selecionadas pelo método da coloração azul/branca. Os DNAs plasmidiais contendo o gene *glnR* foram extraídos por lise alcalina. Para confirmar a inserção do gene *glnR* no vetor pGEM-T Easy, realizamos o sequenciamento pelo método de Sanger. Utilizamos o oligonucleotídeo pUC/M13, que possui um sítio de ligação no vetor pGEM-T Easy à montante da região de inserção do gene *glnR*.

3) Construção do plasmídeo pGEX::*glnR* para expressão da proteína de fusão: o DNA plasmidial obtido das colônias confirmadas foi digerido com as enzimas BamHI e XhoI, obtendo o fragmento de interesse. A reação de ligação será realizada com o fragmento do gene *glnR* e o vetor de expressão pGEX-4T-2. Esta será transformada em células termocompetentes de *E. coli* a fim de obter o plasmídeo pGEX::*glnR*.

### RESULTADOS

1) Confirmação da construção do plasmídeo pGEM::*glnR* pelo método da coloração azul/branca- O vetor pGEM-T Easy contém promotores RNA polimerase SP6 e T7 que flanqueiam uma região de clonagem múltipla dentro da região que codifica o  $\alpha$ -peptídeo, que gera a enzima  $\beta$ -galactosidase, permitindo a identificação de recombinantes por seleção de colônias azul/branca. Àquelas colônias com coloração branca foram previamente confirmadas a inserção do gene *glnR* no vetor pGEM-T Easy. Dentre as colônias com coloração branca, 12 colônias foram selecionadas e seu DNA foi extraído por lise alcalina.



2) Confirmação da inserção do gene *glnR* no vetor pGEM-T Easy pelo método do sequenciamento- três amostras de DNA plasmidial foram selecionados para realizar o sequenciamento pelo método de Sanger. Utilizamos o oligonucleotídeo pUC/M13 que possui um sítio de ligação no vetor pGEM-T Easy à montante da região onde se inseriu o gene. Sendo assim, a sequência amplificada possibilita confirmar a inserção do gene *glnR* no vetor pGEM-T Easy. As sequências amplificadas das três amostras foram idênticas à sequência do gene *glnR*, confirmando a inserção do gene no local de interesse do vetor.

3) Construção do vetor pGEX::*glnR* para expressão da proteína de fusão- A reação de ligação entre o fragmento contendo o gene *glnR* e o vetor pGEX-4T-2 foi transformada em células de *E. coli* mas até o momento não obtivemos sucesso no procedimento.

### PERSPECTIVAS

Está em andamento a clonagem do fragmento contendo o gene *glnR* no vetor pGEX-4T-2 para obter a construção do plasmídeo pGEX::*glnR*. Após esse processo, o plasmídeo construído pGEX::*glnR* será usado para expressar a proteína GlnR e a mesma será purificada. A proteína purificada será utilizada em ensaios de ligação com a região promotora dos operons *nif* e *anf* de *P. riograndensis*.

### REFERÊNCIAS

- Cheng, Q., (2008). Perspectives in biological nitrogen fixation research.: J Integr Plant Biol, v. 50, p 786-98.
- Enkh-Amgalan J, Kawasaki H, Oh-oka H, Seki T (2006). Cloning and characterization of a novel gene involved in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum*: a possible regulatory gene. Arch Microbiol;186:327e37.
- Fernandes G de C., Trarbach L. J., de Campos S. B., Beneduzi A., Passaglia L. M. P. (2014). Alternative nitrogenase and pseudogenes: unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. Research in Microbiology 165, 571 e 580
- Howard JB, Rees DC. Structural basis of biological nitrogen fixation. Chem Ver (1996);96:2965e82.
- Huergo, L., M. Merrick, R. Monteiro, L. Chubatsu, M. Steffens, F. Pedrosa, and E. Souza, (2009), *In vitro* interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. J Biol Chem, v. 284, p. 6674-82.
- Kormelink TG, Koenders E, Hagemeyer Y, Overmars L, Siezen RJ, et al. (2012) Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class Bacilli. BMC Genomics 13: 191–206.