



ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GaoA DE *Fusarium subglutinans* EM UM PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS EUCARIÓTICAS EM *Escherichia coli*

Thiago Moia Apolonio (PIBIC/CNPq/UEM), Kelly Valerio Prates (PIBIC/CNPq/UEM), Fausto Fernandes de Castro, Fabiane Cristina dos Santos, Ione Parra Barbosa Tessmann (Orientadora), e-mail: ipbtessmann@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/
Departamento de Bioquímica / Maringá, PR.

Ciências Biológicas – Bioquímica

Palavras-chave: Galactose oxidase, *Escherichia coli*, Expressão recombinante.

Resumo

A enzima galactose oxidase é uma enzima extracelular produzida por algumas espécies de *Fusarium* e possui várias aplicações biotecnológicas. Em *Fusarium*, a galactose oxidase é codificada por três genes, indicando a presença de pelo menos três isoenzimas. Devido ao baixo potencial de produção dos microrganismos produtores, há uma procura de genes e enzimas homólogos. O gene *gaoA* que codifica a galactose oxidase GaoA de *F. austroamericanum* já foi expresso de forma recombinante em *Escherichia coli*. Considerando interessante o estudo das formas ortólogas da galactose oxidase GaoA, o presente trabalho teve como objetivos analisar a expressão do gene *gaoA* de *F. subglutinans* em um plasmídeo de expressão otimizada de proteínas eucarióticas em *E. coli*.

Introdução

A galactose oxidase é uma enzima de cobre que catalisa a oxidação da D-galactose, com concomitante redução de O_2 para H_2O_2 . Esta enzima é utilizada na determinação da concentração de galactose, na síntese de carboidratos e de aldeídos e no diagnóstico de câncer. O microrganismo com maior capacidade de secreção dessa enzima é o *Fusarium austroamericanum*. Outras espécies produtoras de galactose oxidase são: *Fusarium acuminatum* e *Fusarium subglutinans*.

O gene *gaoA* da galactose oxidase já foi clonado de *F. austroamericanum* (McPHERSON et al., 1992) e já foi expresso de forma recombinante em



Escherichia coli (SUN et al., 2001). O gene *gaoA* de *F. subglutinans* foi clonado anteriormente em nosso laboratório e foi expresso de forma recombinante em *E. coli* sob controle do promotor da T7 RNA polimerase no plasmídeo pET101 (Life Technologies, USA). No entanto, esta expressão ocorreu em baixíssimos níveis.

Considerando o exposto, este projeto teve como objetivos expressar o gene *gaoA* de *F. subglutinans* com uso do plasmídeo de expressão procariótica pTrcHis2® da Life Technologies (USA). Este plasmídeo possui o promotor *trc* e a sequência de um elemento minicistron para aumentar a eficiência da tradução de proteínas eucarióticas em *E. coli*.

Materiais e métodos

Construção do plasmídeo recombinante pTrcHis2®/gaoA

O gene *gaoA* truncado (sem os códons do sinal de secreção e da extremidade aminoterminal de amadurecimento da proteína) de *F. subglutinans* foi amplificado em uma reação de PCR, utilizando como molde um plasmídeo contendo o gene *gaoA* clonado anteriormente e com uso dos iniciadores FW e RV contendo sítios das enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI*, respectivamente. O gene amplificado foi clonado com o kit pGEM®T da Promega (USA) e depois transferido para o plasmídeo pTrcHis2B®. O plasmídeo pTrcHis2B®/*gaoA* obtido foi avaliado por análise de restrição.

Análise de expressão da proteína GaoA em E. coli

O plasmídeo construído e o plasmídeo controle, pTrcHis2B®/*lacZ*, foram utilizados para transformar as cepas DH5α e TOP10 de *E. coli*. Em pequena escala, uma colônia de cada bactéria transformada foi transferida para 5 mL de meio LB-ampicilina. Após incubação por 14 h a 37 °C e 100 rpm, alíquotas de 100 µL das culturas foram transferidas para novos tubos contendo 10 mL de meio ZY-ampicilina (STUDIER, 2005). Estes tubos foram incubados por 4 h a 37 °C e por mais 6 h a 25 °C, a 100 rpm. Alíquotas de 1 mL das culturas foram removidas nos tempos 4 e 10 h e as bactérias foram coletadas por centrifugação (12.000g, 2 min). Os *pellets* obtidos foram adicionados de 100 µL do tampão de carregamento do gel de SDS-PAGE. As bactérias lisadas foram fervidas em banho-maria por 10 min. Após breve centrifugação (12.000g, 1 min), 20 µL do sobrenadante foram aplicados em um gel de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

Em larga escala, uma colônia da bactéria TOP10 transformada com o plasmídeo pTrcHis2B®/*gaoA* foi transferida para 5 mL de meio LB-ampicilina. A cultura foi incubada por 14 h a 37 °C e 100 rpm e uma alíquota



de 500 μ L da cultura obtida foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio ZY-ampicilina. Este frasco foi incubado por 4 h a 37 $^{\circ}$ C e 100 rpm. A cultura foi adicionada de IPTG (concentração final de 1 mM) e foi incubada a 25 $^{\circ}$ C a 100 rpm, por 16 h. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação (4.300g, 5 min) e resuspensas em 5 mL de tampão de lise (NaCl 0,5 M; triton X-100 1%; MgCl₂ 5 mM; tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0). A suspensão foi mantida em banho de gelo e foram adicionados lisozima (150 μ g/mL), DNase I (1-2 U/mL) e PMSF (concentração final de 1 mM). As amostras foram incubadas em gelo por 30 min e a 4 $^{\circ}$ C por 1 h. O homogeneizado obtido foi dialisado em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) contendo CuSO₄·7H₂O 0,4 mM, duas vezes, por um total de 4 h a 4 $^{\circ}$ C. Os restos celulares foram removidos por centrifugação (9.000g, 5 min). O sobrenadante foi utilizado para análise da atividade enzimática conforme metodologia descrita por Tressel & Kosman (1982).

Resultados e Discussão

A análise de restrição do plasmídeo pTrcHis2B@/*gaoA* construído (Figura 1) mostra a correta clonagem e orientação do inserto.

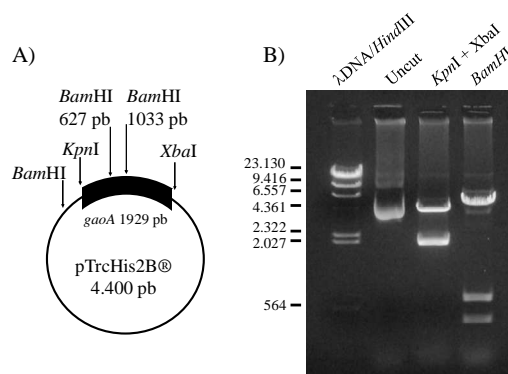


Figura 1 – Análise de restrição do plasmídeo de expressão pTrcHis2B contendo o gene *gaoA* de *F. subglutinans*. A) Mapa de restrição do plasmídeo pTrcHis2B/*gaoA*. B) Gel de eletroforese horizontal em agarose 1% (m/v) mostrando os fragmentos obtidos.

A análise de expressão da proteína em pequena escala não confirmou a produção da enzima GaoA como uma banda proteica predominante, mas mostrou a expressão da proteína LacZ de 125 kDa (Figura 2). No entanto, foi evidenciado que a bactéria TOP10 tinha maior crescimento do que a DH5 α (Figura 2) e ela foi utilizada na análise de expressão em larga escala. A análise de expressão da proteína em larga escala resultou atividade enzimática evidenciada no ensaio enzimático após 16 h de incubação, o que indica que a enzima foi expressa em muito pequena quantidade.

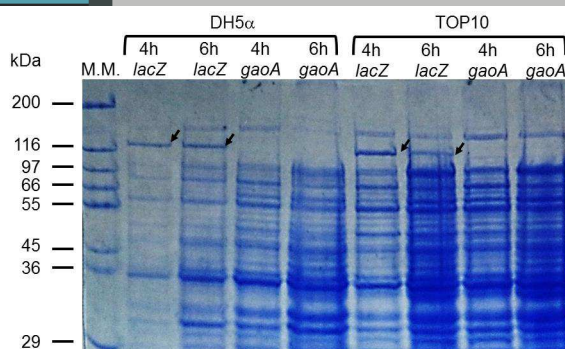


Figura 2 – Gel de SDS-PAGE (7,5%) da análise da expressão em pequena escala, com o plasmídeo pTrcHis2B® em *E. coli*. Flechas indicam a proteína LacZ.

Conclusões

O plasmídeo pTrcHis2®/*gaoA* foi construído corretamente. A proteína GaoA de *F. subglutinans* foi expressa em pequena quantidade com o sistema de expressão utilizado, mas este sistema poderá ser otimizado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pelas bolsas recebidas.

Referências

McPHERSON, M. J.; ÖGEL, Z. B.; STEVENS, C.; YADAV, K. D. S.; KEEN, J. N.; KNOWLES, P. F. Galactose oxidase of *Dactylium dendroides*. Gene cloning and sequence analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 8146-8152, 1992.

SUN, L.; PETROUNIA, I. P.; YAGASAKI, M.; BANDARA, G.; ARNOLD, F. H. Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. **Protein Eng.**, v.14, p. 699-704, 2001.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Prot. Expr. Purif.**, v. 41, p. 207-234, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

TRESSEL, P. S.; KOSMAN, D. J. Galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. **Meth. Enzymol.**, v. 89, p. 163-171, 1982.