

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GALACTOSE OXIDASE GaoA DE *Fusarium subglutinans* EM *Saccharomyces cerevisiae*

Karina Lima dos Reis (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Damaris Batistão Martim (Mestranda/PBC), Fabiane Cristina dos Santos (Doutorando/PBC), Fausto Fernandes de Castro (Doutorando/PBC), 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: GaoA, *Fusarium subglutinans*, Expressão heteróloga.

Resumo

A enzima galactose oxidase é produzida por fungos do gênero *Fusarium*. Esta enzima possui diversas aplicações biotecnológicas como síntese enzimática de aldeídos e carboidratos, dosagem de D-galactose e lactose e diagnóstico precoce de câncer de cólon. Neste trabalho foi avaliada a produção recombinante da galactose GaoA de *Fusarium subglutinans* em *Saccharomyces cerevisiae*.

Introdução

A enzima galactose oxidase catalisa a oxidação de dois elétrons de vários álcoois primários para os aldeídos correspondentes, com a redução do oxigênio para peróxido de hidrogênio. Dentre estes vários álcoois utilizados como substrato, o grupo 6-hidroxi da D-galactose é o grupo preferencial (WHITTAKER, 2005).

Esta enzima foi identificada em meio de cultivo de fungos do complexo de espécies *Fusarium graminearum*, e de outras espécies como *Fusarium subglutinans* e *Fusarium acuminatum*. Esta enzima tem diversas aplicações biotecnológicas e é comercialmente importante. Entretanto, ela é secretada em baixos níveis pelos microrganismos produtores, o que dificulta e encarece sua purificação. É, portanto, de suma importância o desenvolvimento de meios de produção da galactose oxidase em escala comercial.

Previamente, o gene *gaoA* da galactose oxidase de *Fusarium subglutinans* foi clonado e sequenciado em nosso laboratório (FARIA, 2013). Este gene não contém íntrons. A expressão recombinante deste gene em *Escherichia coli* foi possível com uso do plasmídeo pTrcHis, que é um plasmídeo de expressão bacteriana de genes eucarióticos, e com a cepa de *E. coli* Rosetta™(DE3), que é uma cepa apropriada para aumentar a expressão de proteínas eucarióticas que contém tRNAs para códons raramente utilizados em *E. coli*.

Considerando os resultados prévios, e em uma tentativa de aumentar o lucro de proteína recombinante produzida, foi hipotetizado que este gene seria mais bem expresso em um hospedeiro eucariótico como a levedura.

Materiais e métodos

Subclonagem do gene gaoA de F. subglutinans para o plasmídeo de expressão pYES2/CT de S. cerevisiae

O plasmídeo pCR2.1® contendo o gene *gaoA* (2046 pb), previamente clonado (FARIA, 2013), foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação do inserto. O gene *gaoA* (inserto) foi purificado de um gel de eletroforese em agarose 1% com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, USA). O gene *gaoA* purificado foi utilizado como DNA molde em uma reação de PCR com os iniciadores direto (5'-TTGGTACCATGAAGTCCTTTTGGAC) e reverso (5'-TTTCTAGACTGAGTAACGAGAAGAGTAC). O iniciador direto continha uma sequência adicional da enzima de restrição *KpnI* e o iniciador reverso continha a sequência da enzima de restrição *XbaI*. O iniciador reverso não continha o códon de parada, para introduzir uma cauda de His dada pelo vetor de expressão. Os iniciadores amplificaram todo o gene *gaoA*, incluindo a sequência de endereçamento, para que a proteína produzida pudesse ser secretada pela levedura. O produto da reação de PCR foi clonado no vetor de clonagem pCR2.1®, do kit TA cloning (Life Technologies, USA). Após transformação da reação de ligação em *E. coli* DH5 α , o plasmídeo recombinante foi extraído por lise alcalina e analisado por digestão com enzimas de restrição.

O plasmídeo pCR 2.1®-*gaoA* e o plasmídeo pYES2/CT foram digeridos, individualmente, com as enzimas *KpnI* e *XbaI*. O plasmídeo pYES2/CT também foi defosforilado com a enzima fosfatase alcalina. O gene *gaoA* e o plasmídeo pYES2/CT linearizado foram purificados de um gel de eletroforese em agarose 1%, com uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, EUA). O gene *gaoA* foi ligado ao vetor pYES2/CT linearizado com a DNA ligase e o plasmídeo recombinante foi transformado e recuperado em *E. coli* DH5 α . O plasmídeo obtido foi avaliado por análise de restrição.

Expressão heteróloga do gene gaoA de F. subglutinans em S. cerevisiae

Células de *S. cerevisiae* INVSc1 foram transformadas com o plasmídeo pYES2/CT-*gaoA* ou com o plasmídeo pYES2/CT vazio, segundo Gietz & Woods (2002). A levedura transformada foi cultivada em 50 mL do meio CSM (Yeast Nitrogen Base 6,7 g/L; Amino acid dropout mix sem uracila 0,77 g/L; Rafinose 1g/%) por 4 horas a 30 °C, 100 rpm. Após esta incubação, a cultura foi adicionada de galactose 2%, para induzir o promotor *GAL1* do plasmídeo pYES2/CT, e de CuSO₄.5H₂O 2 μ M, para ativar a enzima. Em seguida, a cultura foi incubada a 20 °C, 100 rpm, por 18 horas. Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação (4000g, 5

min). As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônio a 90% de saturação e coletadas por centrifugação (12.000g, 5 min). As proteínas foram resuspenso em tampão acetato de amônio 100 mM, pH 7,0, e dialisadas duas vezes no mesmo tampão adicionado de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mM e uma vez no mesmo tampão sem o cobre.

O sedimento de células transformadas com o plasmídeo pYES2/CT-*gaoA* foi resuspenso em 5 mL do tampão de lise (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, PMSF 1 mM, glicerol 5%, NaCl 50 mM). A 650 μL da suspensão de células foi adicionado o equivalente a 350 μL de pérolas de vidro (425-600 μm , G8772, Sigma, USA). Esta mistura foi agitada em vórtex (5 vezes 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo) e sonicada (5 ciclos de 30 seg ligado e 30 seg desligado, com 50% de amplitude). O homogeneizado obtido foi dialisado duas vezes em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, contendo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mM e centrifugado (9.000g, 5 min).

A atividade de galactose oxidase foi avaliada como descrito em Tressel & Kosman (1982) e as proteínas das frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

Resultados e Discussão

Construção do plasmídeo pYES2/CT-*gaoA*

A Figura 1 mostra o plasmídeo pYES2/CT-*gaoA* construído. Nenhuma atividade de galactose oxidase foi encontrada no meio de cultura da levedura transformada, no dialisado das proteínas precipitadas ou no lisado celular. Um gel de SDS-PAGE (Figura 2) das frações obtidas não detectou nenhuma proteína extremamente expressa com a massa molecular esperada de 66 kDa.

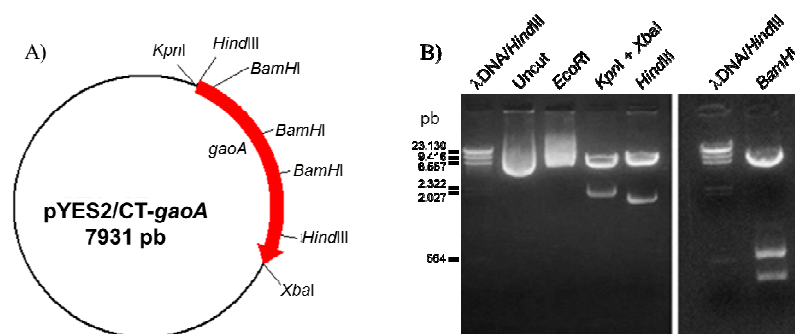


Figura 1 – Análise de restrição do vetor recombinante pYES2/CT-*gaoA*. A) Mapa do plasmídeo construído. B) Eletroforese em gel de agarose de mostrando os fragmentos de DNA obtidos pela digestão do plasmídeo.

Conclusões

O gene *gaoA* de *F. subglutinans* foi subclonado no plasmídeo de expressão de *S. cerevisiae*. No entanto, nenhuma atividade de galactose oxidase ou uma proteína abundantemente expressa foi evidenciada.

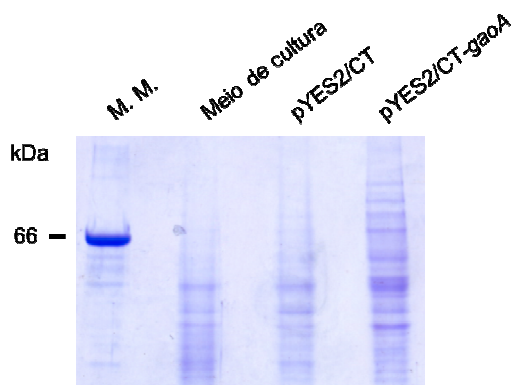


Figura 2 – Análise de SDS-PAGE. M. M. é o marcador molecular, a albumina (5 µg) de 66 kDa. Meio de cultura - dialisado de proteínas (10 µg) precipitadas do meio de cultura da levedura transformada com o plasmídeo pYES2/CT-*gaoA*. pYES2/CT - proteínas (10 µg) obtidas pela fervura do sedimento de células transformadas com o plasmídeo pYES2/CT vazio. pYES2/CT-*gaoA* - proteínas (10 µg) do sedimento de células transformadas com o plasmídeo pYES2/CT-*gaoA* lisadas por agitação com pérolas de vidro e sonicção.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária, ao CNPq e à CAPES pelas bolsas de estudo concedidas.

Referências

FARIA, C. B. **Genes da galactose oxidase de *Fusarium* spp. - Clonagem, expressão e aplicações.** 2013. 142f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single stranded-carrier DNA/polyethylene glycol method. **Meth. Enzymol.**, v. 350, p.87-96, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680-5, 1970.

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

WHITTAKER, J. W. The radical chemistry of galactose oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 433, p. 227-239, 2005.