

CLONAGEM E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DO GENE DA L-ASPARAGINASE TIPO II DE *Pseudomonas putida*

Bárbara Barizão Nogueira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bruna Yuki Tagomori (PBC/UEM), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientadora), e-mail: ipbtessmann@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento (CNPq): Bioquímica (2.08.00.00-2).

Palavras-chave: *Pseudomonas putida*, L-Asparaginase, Expressão recombinante.

Resumo

A L-asparaginase (ASNase) de bactérias é utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda. Os efeitos colaterais da ASNase são hipersensibilidade e toxicidade, sendo esta última causada pela presença de atividade contaminante de L-glutaminase (GLNase) e urease. Previamente, foi encontrada uma cepa de *Pseudomonas putida* produtora de ASNase, sem produção de GLNase ou urease. Este trabalho teve como objetivo a clonagem e a expressão recombinante do gene da ASNase tipo II de *P. putida*. Este gene foi amplificado por PCR e clonado em vetores de expressão bacteriana. Os resultados indicaram que a maior produção da enzima (23 U/mL de cultura) ocorreu com o plasmídeo pET15b, que fornece uma cauda de His₆ N-terminal para a proteína expressa, com a *E. coli* BL21 Star™(DE3) e quando a bactéria foi cultivada a 37 °C após a indução com 1,0 mM de IPTG.

Introdução

A L-asparaginase (ASNase) é utilizada no coquetel quimioterápico contra a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (TAHIRA et al., 2016). Esta droga depleta a L-asparagina (Asn) do sangue e as células tumorais morrem por apoptose, pois dependem de Asn exógena. As preparações terapêuticas comerciais de ASNase são das bactérias *Escherichia coli* ou *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, a ASNase pode causar reações de hipersensibilidade e de toxicidade, devido à produção de anticorpos anti-ASNase pelo paciente ou por causa da presença de atividade de L-glutaminase (GLNase) e de urease nas preparações da ASNase (TAHIRA et al., 2016).

Em bactérias, há duas classes de ASNases, a do tipo I, presente no citosol com atividade de ASNase e GLNase e baixa afinidade pelo substrato, e a do tipo II, altamente específica para a Asn e localizada no periplasma.

Recentemente em nosso laboratório, foi isolada a cepa de *Pseudomonas putida* FEI3 33 de grãos de milho com sinais de podridão, coletados na Fazenda Experimental de Iguatemi (Maringá, PR). Esta cepa produziu atividade de ASNase, mas não de GLNase ou urease em meios sólidos seletivos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de clonar e expressar o gene da ASNase tipo II deste isolado de *P. putida*.

Materiais e métodos

Extração do DNA genômico do isolado de P. putida FEI3 33

O DNA genômico foi extraído por coleta das células de 1,5 mL de uma cultura em meio LB (5 mL, 18 h, 37 °C, 100 rpm), lavagem por centrifugação (9.000g, 1 min) em 500 µL de tampão TE e ressuspensão em 200 µL de tampão TE. Após fervura em banho-maria por 10 min e centrifugação (9.000g, 5 min), o sobrenadante (DNA) foi estocado a -20 °C.

Amplificação e clonagem do gene da ASNase tipo II de P. putida FEI3 33

Genes de ASNase tipo II de *P. putida* foram encontrados no GenBank e alinhados com o programa CLUSTAL Omega. Iniciadores foram desenhados para a região codificante da proteína madura, sem a sequência que codifica o peptídeo sinal, o qual foi identificado com o programa SignalP 4.0. Para clonar o gene no plasmídeo pET15b, foram utilizados o iniciador direto 5'-TTCATATGAAAGAAGCCGAAACCCA RCAG, com um sítio para a enzima *NdeI* (sublinhado), e o iniciador reverso 5'-TTG GATCCTCAGTATTCCCAGAAAATCCG, com um sítio para a enzima *BamHI* (sublinhado) e o códon de parada (sublinhado duplo). Para amplificar o gene a ser clonado no plasmídeo pET21a(+), foram utilizados o mesmo iniciador direto (acima) e o iniciador reverso 5'-TTAAGCTTGTATTCCCAGAAAATCCG, com um sítio para a enzima *HindIII* (sublinhado) e sem o códon de parada.

O gene da ASNase tipo II da cepa de *P. putida* foi amplificado pela reação da polimerase em cadeia (PCR) com os dois conjuntos de iniciadores e com a Accu Taq LA DNA polimerase High Fidelity (Sigma-Aldrich, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados com o kit TOPO TA Cloning (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os plasmídeos obtidos foram produzidos por transformação em *E. coli* TOP10 e posterior lise alcalina. Os genes clonados foram transferidos para os vetores de expressão pET15b e pET21a(+), por meio de digestão e ligação. Os plasmídeos resultantes foram analisados por digestão com enzimas de restrição.

Otimização da expressão da ASNase tipo II recombinante de P. putida FEI3 33

Sessenta nanogramas dos vetores vazios ou recombinantes foram transformados em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ou Roseta™ (DE3). As células transformadas foram cultivadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) por 18 h a 37 °C, com agitação de 100 rpm. Cem µL da cultura obtida foram utilizados para inocular 10 mL de meio LB-ampicilina. Após uma incubação por 4 h (37 °C, 100 rpm), isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado para induzir a expressão da proteína. As células foram, então, incubadas por 18 h a 20 ou 37 °C, a 100 rpm, coletadas por centrifugação (2.000g, 10 min, 4°C) e ressuspensas em 2,0 ou 4,0 mL do tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5) contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1,0 mM. As células coletadas foram rompidas por sonicação (32 ciclos de 15 s: 5 s ligado e 10 s desligado; com amplitude de 40%). O sonicado foi centrifugado (10.000g, 5 min, 4 °C). Para o ensaio enzimático de ASNase, 100 µL do sobrenadante foram incubados com 900 µL de Asn (40 mM) em tampão Tris 50 mM

(pH 8,6) por 3 h a 37 °C. A reação foi parada com adição de 100 µL de ácido tricloroacético 1,5 M. Após centrifugação (10.000g, 5 min, 4 °C), 200 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL do Reativo de Nessler e 1,6 mL de água e incubados por 20 min a temperatura ambiente, antes da leitura de absorbância a 425 nm. O sulfato de amônio foi usado como padrão e uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µM de amônia por min.

A concentração de proteínas do sobrenadante, homogeneizado e sedimento do sonicado foi determinada pelo método de Bradford, com albumina como padrão. Uma alíquota de 10 µg das proteínas de cada fração foi analisada por SDS-PAGE.

Resultados e Discussão

Amplificação e clonagem do gene da ASNase tipo II de *P. putida* FEI3 33

Os iniciadores desenhados foram eficientes em amplificar o gene (935 pb) da ASNase tipo II de *P. putida* (Figura 1A). Os plasmídeos pET15b e pET21a(+) fornecem para a proteína expressa uma cauda de His₆ N-terminal e C-terminal, respectivamente (Figuras 1B e C). A análise de restrição mostrou que os plasmídeos foram construídos eficientemente (não mostrado).

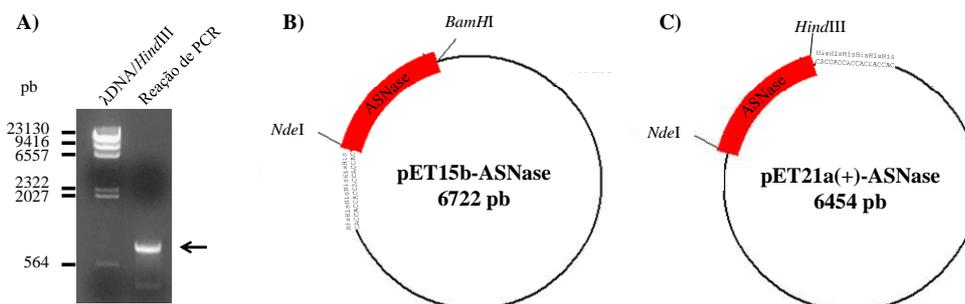


Figura 1 – A) Gel de agarose 1,5% mostrando o produto de DNA amplificado; B) Mapa do plasmídeo pET15b-ASNase. C) Mapa do plasmídeo pET21a(+)-ASNase.

Otimização da expressão da ASNase tipo II recombinante de *P. putida* FEI3 33

Na expressão da ASNase de *P. putida* com o plasmídeo pET15b em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) cultivada a 20 °C, após indução com 1,0 mM de IPTG, foram produzidas 9,8 U/mL de cultura (total de 98 U nos 10 mL de cultura) (Fig. 2A). Um lucro maior de produção de 340.95 U de ASNase de *P. fluorescens* foi obtido por SINDHU & MANONMANI (2018) em 10 mL de cultura de *E. coli*. No entanto, KOTZIA & LABROU (2007) verificaram a produção de apenas 25.5 U da ASNase de *E. chrysanthemi* em 1 L de cultura de *E. coli*.

Nenhuma banda de proteína com maior intensidade, com a massa molecular prevista para a ASNase de 38 kDa, foi verificada nas frações do sonicado das cepas BL21 Star™ (DE3) e Roseta™ (DE3) de *E. coli* transformadas com os plasmídeos recombinantes (Figuras 2B e C, respectivamente). A atividade de ASNase não foi avaliada no sobrenadante do sonicado de células de *E. coli* Roseta™ (DE3).

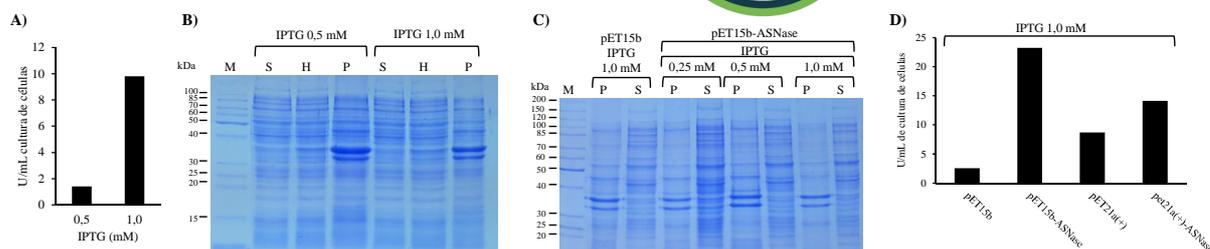


Figura 2. Otimização da expressão da ASNase tipo II de *P. putida* FEI3 33. A) Atividade de ASNase em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pelo plasmídeo pET15b-ASNase, com cultivo a -20 °C, após a indução. B) SDS-PAGE 10% com as proteínas das frações dos sonicados das células do experimento descrito na Figura 2A. M – PageRuler™ unstained protein ladder (Thermo Fisher Scientific, EUA). S - sobrenadante. H – homogeneizado. P – pellet. C) SDS-PAGE 7,5% com as proteínas das frações do sonicação de células de *E. coli* Roseta™ (DE3) transformadas com os plasmídeos pET15b ou pET15b-ASNase, com cultivo a -20 °C, após a indução. D) Atividade de ASNase em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pelos plasmídeos pET15b e pET21a(+) vazios ou com o gene da ASNase, com cultivo a 37 °C, após a indução.

A análise de expressão da ASNase tipo II de *P. putida* com o plasmídeo pET15b-ASNase em *E. coli* BL21 Star™ (DE3), com cultivo a 37 °C por 18 h após a indução com 1,0 mM de IPTG, resultou em uma produção de 23 U/mL de cultura de bactérias (total de 230 U nos 10 mL de cultura) (Figura 2D). A produção da enzima pelo plasmídeo pET21a(+) não foi maior do que pelo plasmídeo pET15b.

Conclusões

O gene de ASNase tipo II da cepa de *P. putida* FEI3 33 foi amplificado e clonado nos plasmídeos pET15b e pET21a(+). A expressão da ASNase recombinante foi maior com o plasmídeo pET15b, que fornece uma cauda de His₆ N-terminal para a proteína expressa, e com temperatura de cultivo de 37 °C após a indução com 1,0 mM de IPTG. A futura produção da enzima em larga escala possibilitará a sua purificação e caracterização.

Agradecimentos

Agradecemos à UEM pela bolsa de PIBIC e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências

KOTZIA, G.A.; LABROU, N.E. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemii* 3937: cloning, expression and characterization. **J. Biotechnol.**, v. 127, p. 657-669, 2007.

SINDHU, R.; MANONMANI, H.K. Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. **Protein Expr. Purif.**, v. 143, p. 83-91, 2018.

TAHIRA, B.; MAKKY E.A.; JALAL, M.; YUSOFF, M.M. A Comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 178, p. 900–923, 2016.