

CLONAGEM E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DO GENE *gaoA* DE *Fusarium incarnatum-equiseti*

Rafaela Del Pintor de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Damaris Batistão Martim (PBC/UEM), Fausto Fernandes de Castro (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: Galactose oxidase, *Escherichia coli*, Fungo.

Resumo:

A galactose oxidase oxida a D-galactose e é usada para dosagem de galactose, síntese de carboidratos e diagnóstico precoce de câncer de cólon, entre outros. Os fungos *Fusarium austroamericanum*, *Fusarium subglutinans* e *Fusarium acuminatum* são os principais produtores. A cepa *F. acuminatum* UnB 356, produtora de galactose oxidase, foi reclassificada em nosso laboratório como *Fusarium incarnatum-equiseti*. Considerando relevante o estudo de formas ortólogas da galactose oxidase, o gene *gaoA* de *F. incarnatum-equiseti* foi clonado em vetores de expressão bacteriano e estudos preliminares de expressão em *E. coli* foram realizados. Embora nenhuma expressão tenha sido inicialmente observada, estudos de otimização estão em andamento.

Introdução

A galactose oxidase é uma proteína de cobre monomérica, que catalisa a oxidação de dois elétrons da D-galactose e outros álcoois primários para os aldeídos correspondentes, com concomitante redução de oxigênio para peróxido de hidrogênio (SOLOMON et al., 2014). Esta enzima é usada para dosagem de D-galactose e lactose, síntese enzimática de aldeídos e carboidratos, coloração histoquímica e citoquímica e detecção precoce de câncer de cólon, entre outros. Esta enzima é secretada por fungos filamentosos do gênero *Fusarium*, como *Fusarium austroamericanum*, *Fusarium subglutinans* e *Fusarium acuminatum*. O *F. acuminatum* UnB 356, produtor de galactose oxidase, foi reclassificado pelo nosso grupo como um membro do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti*. O gene da galactose oxidase (*gaoA*) de *F. austroamericanum* não possui íntrons e já foi expresso de forma heteróloga em fungos filamentosos, em levedura, na bactéria *Escherichia coli* e no sistema *in vitro* RTS ("Rapid Translation System"). Os genes *gaoA* de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum* e *F. subglutinans* também já foram clonados e expressos em *E. coli*. No entanto, não há relatos na literatura de estudos de expressão recombinante do gene *gaoA* de *Fusarium incarnatum-equiseti*. Portanto, este trabalho teve como objetivo clonar o gene *gaoA* deste fungo e estudar sua expressão em *E. coli*.

Materiais e métodos

Microrganismos

O fungo *F. incarnatum-equiseti* UnB 356 está sendo mantido em ágar batata dextrose (BDA) inclinado com repiques trimestrais. A cepa DH5 α TM de *E. coli* foi utilizada para a propagação dos plasmídeos. As cepas BL21 StarTM (DE3) e RosettaTM (DE3) de *E. coli* foram usadas como sistemas de expressão procarióticos e estão sendo mantidas em meio Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0), com 50% glicerol, a -20 °C.

Extração de DNA

O fungo *F. incarnatum-equiseti* UnB 356 foi cultivado em 25 mL de meio batata dextrose líquido, de forma estacionária, a 25 °C, com fotoperíodo de 12h. O inóculo consistiu de um pedaço fragmentado de 1 cm³ de uma cultura recente de ágar inclinado. Após cinco dias de cultivo, o micélio foi coletado por filtração em gaze estéril e foi macerado em um gral de porcelana com nitrogênio líquido. Uma alíquota de 300 μ L do micélio macerado foi transferida para um microtubo e o DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Koenig et al. (1997). O DNA final foi armazenado em tampão TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), a -20 °C.

Amplificação e clonagem do gene gaoA de F. incarnatum-equiseti

Inicialmente, foram amplificadas do DNA genômico de *F. incarnatum-equiseti* UnB 356, por PCR, duas metades do gene *gaoA*, com iniciadores para as extremidades 5' e 3', desenhados a partir da sequência do gene encontrado no genoma sequenciado de uma das espécies deste complexo, e iniciadores internos, desenhados para regiões bem conservadas do gene *gaoA* de *Fusarium* spp. Os fragmentos amplificados foram clonados com o kit TOPOTA Cloning® (Thermo Fisher Scientific, EUA) e tiveram suas extremidades sequenciadas.

Com as sequências obtidas, iniciadores foram desenhados (FW 5'-GCCTCGGCGCCCATTTGGAAGTACC e RV 5'-TTATTGAGTAATGCGAATTGTCGTA) para amplificar do DNA genômico do fungo, por PCR, a região que codifica a proteína madura do gene *gaoA*, com a enzima de alta fidelidade AccuTaqTM LA DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, EUA). O gene amplificado foi clonado (kit TOPOTA Cloning®, Thermo Fisher Scientific, EUA). O plasmídeo recombinante obtido foi transformado em *E. coli* e recuperado por lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Subclonagem do gene do vetor de clonagem para os vetores de expressão

Para amplificar o gene a ser clonado no plasmídeo pET21a(+), foram utilizados um iniciador FW (5'-TTCATATGGCCTCGGCGCCCATTTGGAAGTACC), que tinha um sítio da enzima *Nde*I (sublinhado), e um iniciador RV (5'-TTAAGCTTTTGGAGTAATGCGAATTGTCG), com um sítio da enzima *Hind*III (sublinhado). Para amplificar o gene a ser clonado no plasmídeo pTrcHis2B, foram utilizados um iniciador FW (5'-TTGGTACCGCCTCGGCGCCCATTTGGAAGTACC), que tinha um sítio para a

enzima *KpnI* (sublinhado), e um iniciador RV (5'-TTTCTAGAcgTTGAGTAATGCGAATTGTC GTA), que tinha um sítio para a enzima *XbaI* (sublinhado) e dois nucleotídeos adicionais para deixar o gene na janela de leitura correta (letra minúscula). Nos dois iniciadores RV não havia códon de parada, para adicionar na proteína uma cauda de histidinas na extremidade C-terminal, dada pelos plasmídeos utilizados. Em todos os iniciadores havia um par TT na extremidade 5', para proteção dos sítios de restrição.

Estes iniciadores foram utilizados em reações de PCR com a enzima de alta fidelidade AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, EUA) e 100 ng do gene *gaoA* cortado do plasmídeo de clonagem, eletroforizado e purificado do gel com o kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados (gene *gaoA*) foram clonados (kit TA cloning, Thermo Fisher Scientific, EUA, ou pGEM®-T Easy, Promega, EUA). Os plasmídeos recombinantes obtidos foram transformados em *E. coli* e recuperados por lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Os genes clonados foram transferidos para os plasmídeos de expressão com a tecnologia clássica de corte com enzimas de restrição, purificação em gel de agarose e ligação com a DNA ligase (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Teste de expressão da proteína GaoA de F. incarnatum-equiseti em E. coli

Os vetores de expressão construídos (60 ng) foram transformados em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ou Rosetta™ (DE3). As células transformadas foram cultivadas em 10 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) por 18 h a 37 °C, com agitação orbital (100 rpm). Cem µL da cultura obtida foram utilizados para inocular 10 mL de meio LB com ampicilina. Após incubação por 4 h (37 °C, 100 rpm), isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado (1 mM) para induzir a expressão da proteína. As células foram incubadas por 18 h (20 °C, 100 rpm), coletadas por centrifugação (4.000xg, 5 min) e ressuspensas em 5,0 mL do tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1,0 mM). As células coletadas foram rompidas por 3 ciclos de sonicação (32 ciclos de 15 s: 5 s ligado e 10 s desligado; com amplitude de 40%). O sonicado foi centrifugado (12.000xg, 5 min) e a atividade enzimática foi analisada no sobrenadante como descrito em Tressel & Kosman (1982).

Resultados e Discussão

Construção dos vetores de expressão pTrcHis2B-gaoA e pET21a(+)-gaoA

Dois fragmentos do gene *gaoA* de *F. incarnatum-equiseti* UnB 356 foram amplificados do DNA genômico do fungo, clonados e parcialmente sequenciados. Em seguida, o gene *gaoA* truncado foi clonado do DNA genômico de *F. incarnatum-equiseti* UnB 356. Este gene serviu de molde para amplificação, clonagem e subclonagem do gene em vetores de expressão, pela tecnologia do DNA recombinante (Figura 1).

Expressão da proteína GaoA de F. incarnatum-equiseti UnB 356 em E. coli

Embora nenhuma expressão tenha sido inicialmente observada, estudos de otimização estão em andamento.

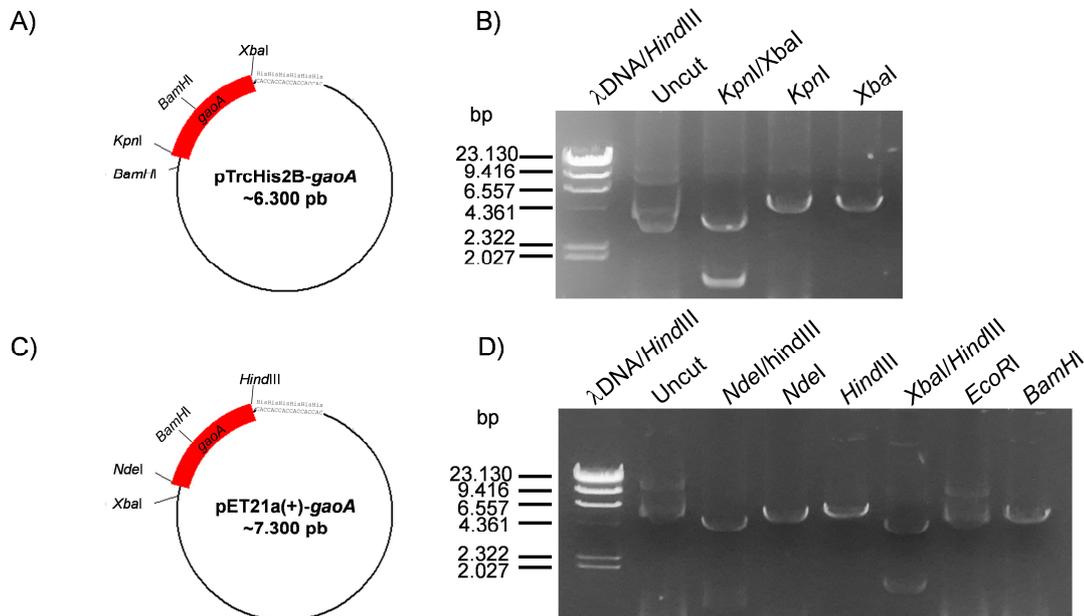


Figura 1. Plasmídeos de expressão. A) Plasmídeo pTrcHis2B-gaoA. B) Análise de restrição do plasmídeo pTrcHis2B-gaoA. C) Plasmídeo pET21a(+)-gaoA. D) Análise de restrição do plasmídeo pET21a(+)-gaoA.

Conclusões

Dois plasmídeos de expressão contendo o gene *gaoA* de *F. incarnatum-equiseti* UnB 356 foram construídos. Nenhuma expressão recombinante da enzima foi observada na análise preliminar realizada. No entanto, futuros experimentos de otimização da expressão heteróloga possibilitarão a purificação e a caracterização da enzima.

Agradecimentos

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

Referências

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; & KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, v. 87, p. 915-923, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Third edition. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999 p, 2001.

SOLOMON, E.I.; HEPNER D.E.; JOHNSTON, E.M.; GINSBACH, J.W.; CIRERA, J.; QAYYUM, M.; KIEBER-EMMONS, M.T.; KJAERGAARD, C.H.; HADT, R.G.; TIAN L. Copper Active Sites in Biology. **Chem. Rev.**, v. 114, p. 3659-3853, 2014.

29º Encontro Anual de Iniciação Científica
9º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



29 a 31 de outubro de 2020

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