

EXPRESSÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE GaoA DE *Fusarium austroamericanum* EM *Saccharomyces cerevisiae*

Lucas Yudai Nozaki (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nathalia Rodrigues Bulka (PBC/UEM), Fausto Fernandes de Castro (DBQ/UEM), Ione Parra Barbosa Tessmann (Orientadora), e-mail: ipbtessmann@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento (CNPq): 2.08.04.00-8 – Bioquímica –
Biologia Molecular

Palavras-chave: Galactose oxidase, *Saccharomyces cerevisiae*, Fungo.

Resumo

A enzima galactose oxidase, produzida por fungos do gênero *Fusarium*, é uma enzima que possui grande importância biotecnológica devido as suas diversas aplicações. Estudos anteriores mostraram a expressão da enzima galactose oxidase GaoA do gene *gaoA* inteiro de *Fusarium austroamericanum* em *Saccharomyces cerevisiae*, mas em níveis baixos. O objetivo deste trabalho foi o de expressar maiores quantidades da enzima GaoA em *S. cerevisiae* com uso do gene *gaoA* truncado de *F. austroamericanum*, sem sequências codificantes do peptídeo sinal e do peptídeo de amadurecimento. O gene *gaoA* truncado de *F. austroamericanum* foi amplificado, clonado e subclonado em um plasmídeo de expressão de levedura. Os estudos de expressão mostraram que a enzima GaoA foi expressa em *S. cerevisiae* com o gene *gaoA* truncado em maior quantidade do que quando o gene inteiro foi utilizado.

Introdução

A enzima galactose oxidase é uma metaloproteína, contendo cobre em sua estrutura, que catalisa a oxidação de álcoois primários em seus aldeídos correspondentes, reduzindo oxigênio em peróxido de hidrogênio (SOLOMON et al., 2014). Esta enzima possui várias aplicações biotecnológicas como dosagem de lactose, síntese de aldeídos e carboidratos e detecção precoce de câncer de cólon (SOLOMON et al., 2014).

O gene *gaoA* que codifica a galactose em *F. austroamericanum* não apresenta íntrons e a parte codificante corresponde a 2043 pb e, portanto, a uma proteína imatura com 680 aminoácidos. Após clivagem do peptídeo sinal e de uma sequência de amadurecimento a proteína madura é formada com 639 aminoácidos.

Apesar de sua importância biotecnológica, a produção da enzima pelo *F. austroamericanum* é de baixo nível, tornando o processo de produção e

purificação difícil e dispendioso. Portanto, o desenvolvimento de novos meios de produção dessa enzima, visando maior eficiência e produtividade se mostram extremamente importantes. O gene *gaoA* já foi usado em estudos de expressão heteróloga na levedura *Pichia pastoris* e em bactéria (SPADIUT et al., 2010), mas nunca na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em estudos anteriores (REIS, 2017), o gene *gaoA* inteiro, que codifica a enzima imatura da galactose oxidase de *F. austroamericanum*, foi expresso de forma intracelular em pequenas quantidades em *Saccharomyces cerevisiae*.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi o de expressar maiores quantidades da enzima GaoA de *F. austroamericanum* em *S. cerevisiae* com uso do gene *gaoA* truncado, que codifica a forma madura da proteína, sem os peptídeos de secreção e de amadurecimento.

Materiais e métodos

Construção do plasmídeo pYES2/CT-*gaoA* truncado de *F. austroamericanum*

Primers para amplificar o gene *gaoA* truncado (sem as sequências que codificam os peptídeos de endereçamento e amadurecimento) de *F. austroamericanum* foram desenhados: FW 5'- TTAAGCTTatgGCCTCAGCA CCTATCGGAAGC e RV 5'- TTTCTAGACTGAGTAACGCGAATCG. Sublinhado no iniciador direto e reverso estão sítios das enzimas de restrição *Hind*III e *Xba*I, respectivamente. No iniciador FW há um códon do início da tradução (minúsculo). O iniciador RV não tinha códon de parada, para introdução uma cauda de His pelo vetor. Dois Ts nas extremidades 5' protegiam os sítios de restrição.

A reação de PCR foi realizada com: tampão da enzima 1X; MgCl₂ 1,5 mM; 0,3 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada iniciador; 2,5 U de Accu Taq™ LA DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, EUA) e 20 ng do gene *gaoA* inteiro em um volume total de 25 µL. O gene *gaoA* utilizado como molde foi obtido da digestão do plasmídeo pCR2.1-*gaoA* inteiro, previamente clonado em nosso laboratório, com enzima *Hind*III, separação em gel de agarose 1% e purificação do gene com kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, EUA). A reação de PCR foi realizada com 25 ciclos de: 1 min e 30 seg a 94 °C; 1 min e 30 seg a 62 °C e 2 min a 68 °C. A amostra foi aquecida por 5 min a 94 °C antes dos ciclos e, por 10 min a 72 °C após os ciclos. O fragmento de DNA amplificado de 2 Kb foi visualizado em gel de agarose 1% e clonado com uso do kit TA Cloning® (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme protocolo do fabricante. O plasmídeo recombinante obtido foi transformado em *E. coli* TOP10 e recuperado por lise alcalina.

O gene *gaoA* truncado clonado no plasmídeo pCR2.1® foi então transferido para o plasmídeo pYES2/CT com uso do corta e cola da tecnologia do DNA recombinante. O plasmídeo recombinante pYES2/CT-*gaoA* truncado produzido foi transformado em *E. coli* DH5α e recuperado por lise alcalina. A análise do plasmídeo obtido foi feita por análise de restrição e

sequenciamento com os primers promotor *GAL1* direto e *CYC1* revertido, direcionados para o plasmídeo pYES2/CT na região de clonagem.

Expressão do gene gaoA de F. austroamericanum em S. cerevisiae

Células de *S. cerevisiae* INVSc1 foram transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-*gaoA* truncado, pYES2/CT vazio e pYES2/CT-*gaoA* inteiro, com toda a região codificante do gene *gaoA* de *F. austroamericanum* e construído anteriormente por Reis (2017). A transformação foi feita de acordo com Gietz & Woods (2002) e, após a transformação, a levedura foi inoculada em meio CSM (base nitrogenada para leveduras 6,7 g/L, mix de aminoácidos sem a presença de uracila 0,77 g/L, glicose 10 g/L, ágar 16 g/L) e incubada por 48 horas a 30 °C, para seleção de células transformadas.

Para a expressão da proteína recombinante, uma UFC da levedura transformada foi transferida para 5 mL de meio CSM e cultivada por 24 horas a 30 °C, sob agitação de 100 rpm. Um mL da cultura obtida foi utilizado para inocular 10 mL de meio YPG líquido [extrato de levedura 1 g/%, peptona 2 g/% e galactose 2 g/%] em frasco de penicilina. Estes frascos foram incubados por 24 horas a 30 °C. As células obtidas foram coletadas por centrifugação (2.000g, 5 min) e lisadas como descrito por Meinsinger et al. (2006). O homogeneizado obtido foi centrifugado (12.000g, 5 min), e a atividade enzimática foi analisada no sobrenadante adicionado de 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para ativação da enzima. Alíquotas do pellet, homogeneizado e sobrenadante (10 µg) foram analisadas em gel de SDS-PAGE 7,5%.

Ensaio enzimático

A mistura do ensaio consistiu de: 50 µL da amostra, 50 µL de D-galactose 0,5 M (final de 25 mM final), tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, 2 U/mL de peroxidase e 100 µM de ABTS em um volume final de 1,0 mL. A reação foi incubada por 10 min a 30 °C antes da leitura a 420 nm. Uma curva de calibração do ABTS (10–50 µmol) foi realizada com 4,35 mM de H_2O_2 . Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade da enzima necessária para catalisar a oxidação de 2 µmol de ABTS, correspondente a oxidação de 1 µmol de D-galactose por min, nas condições descritas acima.

Resultados e Discussão

Na expressão da galactose oxidase de *F. austroamericanum* com o plasmídeo pYES2/CT-*gaoA* truncado em *S. cerevisiae* foi produzido um total de 153 U/10 mL de meio de cultura em 24 h ($637,5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de cultura; atividade específica de 9,6 U/mg de proteína) (Figura 1A). A produção da enzima do gene inteiro foi muito menor e com um alto desvio padrão. O lucro obtido com o plasmídeo truncado foi maior do que o obtido por Spadiut et al. (2010), com expressão do gene *gaoA* em *E. coli* de $180 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, e

intracelular e extracelular em *P. pastoris* de $120 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $610 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Nenhuma banda de proteína com maior intensidade com a massa molecular prevista para a galactose oxidase (66 kDa) foi verificada nas frações do pellet, homogeneizado e sobrenadante da levedura transformada com os plasmídeos recombinantes (Figuras 1B).

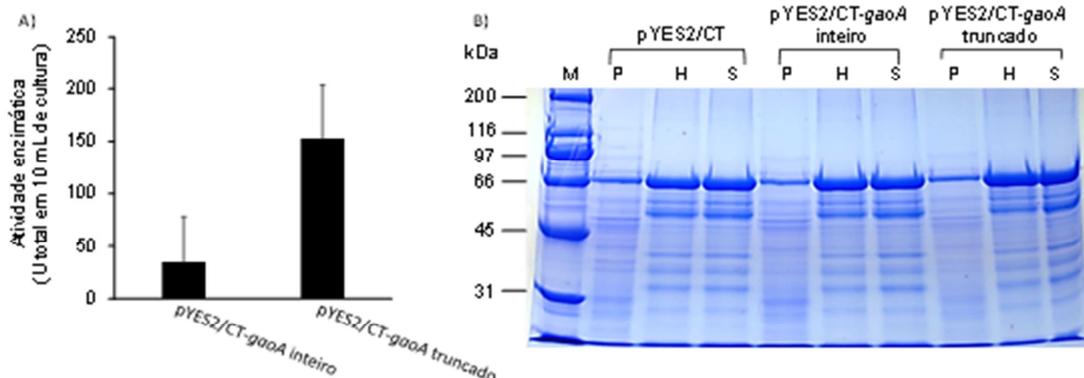


Figura 1 – A) Expressão da proteína recombinante GaoA de *F. austroamericanum* dos plasmídeos pYES2/CT-gaoA inteiro e pYES2/CT-gaoA truncado. B) Gel de SDS-PAGE das proteínas de *S. cerevisiae* transformada com os plasmídeos: pYES2/CT (vazio), pYES2/CT-gaoA inteiro e pYES2/CT-gaoA truncado. P – Proteínas do pellet. H – Proteínas do homogeneizado. S – Proteínas do sobrenadante. M – Marcador.

Conclusões

O plasmídeo pYES2/CT-gaoA truncado produzido e *S. cerevisiae* como célula hospedeira representam um ótimo sistema de expressão da enzima galactose oxidase, que possibilitará a futura purificação e caracterização da enzima.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC.

Referências

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

MEISINGER, C.; PFANNER, N.; TRUSCOTT, K. N. Isolation of yeast mitochondria. **Methods Mol. Biol.**, v. 313, p. 33-39, 2006.

REIS, K.L. Análise da expressão do gene *gaoA* de *Fusarium austroamericanum* em *Saccharomyces cerevisiae*. **Trabalho de conclusão de Curso**. Bioquímica. Universidade Estadual de Maringá, 2017.

SOLOMON, E.I.; HEPPNER, 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.

SPADIUT, O.; OLSSON, L.; BRUMER III, H. A comparative summary of expression systems for the recombinant production of galactose oxidase. **Microb. Cell Fact.**, v. 9, artigo 68, 2010.