

ANÁLISE DA EXPRESSÃO RECOMBINANTE DAS ARGINASES I E II DE RATO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Giovanna Porto Lima (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientador). E-mail: ipbtessmann@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Bioquímica / Biologia Molecular.

Palavras-chave: cDNAs de arginases; Plasmídeo pYES2/CT; Proteína recombinante.

RESUMO

A arginase I, localizada no fígado e no citosol, catalisa a hidrólise da L-arginina no ciclo da ureia. Os mamíferos também possuem a arginase II, de localização mitocondrial, que regula a concentração de arginina e está presente em diversos outros tecidos. As arginases participam ainda de vários outros processos em diferentes tipos celulares. Por isso, inibidores dessa enzima são considerados potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças. Neste trabalho, os cDNAs das arginases I e II de rato foram subclonados em um plasmídeo de expressão e heterologamente expressos em *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados indicam que a expressão poderá ser otimizada em estudos futuros voltados à avaliação de inibidores.

INTRODUÇÃO

A arginase é uma metaloenzima binuclear de manganês que hidrolisa a L-arginina em L-ornitina e ureia (LI *et al.*, 2022). Em mamíferos, existem duas isoformas da enzima, arginase I e arginase II, ambas de organização trimérica. O monômero da arginase I possui 323 aminoácidos (35 kDa), enquanto o da arginase II tem 354 aminoácidos (38 kDa). A arginase I é uma enzima hepática e citosólica, envolvida no ciclo da ureia. Já a arginase II é mitocondrial e predominantemente encontrada nos rins, próstata, intestino delgado e glândula mamária em lactação, atuando na regulação da concentração de arginina para a produção de óxido nítrico e poliaminas.

As arginases também participam em processos como proliferação celular, senescência, apoptose, autofagia e respostas inflamatórias em diferentes tipos celulares, além de contribuírem para a síntese proteica e atuarem como precursoras de diversos metabólitos. Dessa forma, a expressão desregulada dessas enzimas está associada a diversas patologias, incluindo doenças cardiovasculares, inflamatórias intestinais, Alzheimer e câncer (LI *et al.*, 2022).

Por esta razão, moléculas inibidoras e vacinas direcionadas contra as arginases foram desenvolvidas e testadas clinicamente para o tratamento de doenças

cardiovasculares, bem como de cânceres do trato colorretal, mama, pulmão, entre outros, configurando ainda um campo promissor de investigação (PUDLO *et al.*, 2017).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram subclonar os cDNAs das arginases I e II de rato em um vetor de expressão para *Saccharomyces cerevisiae* e avaliar a expressão das enzimas, com vistas a estudos futuros envolvendo inibidores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

A cepa de *Escherichia coli* DH5 α TM (Life Technologies, EUA) foi armazenada em meio Luria Bertani (LB), acrescido de glicerol 50% (v/v), a -20 °C. A cepa diploide de crescimento rápido de *S. cerevisiae* INVSc1 foi mantida em meio YPD a 4 °C.

Subclonagem dos genes das arginases I e II no plasmídeo pYES2/CT

Os cDNAs das arginases I e II de rato foram previamente obtidos em nosso laboratório por RT-PCR, a partir de mRNA hepático e renal, respectivamente, e clonados no plasmídeo de clonagem pCR2.1 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os plasmídeos pCR2.1-Arginase-I, pCR2.1-Arginase-II e pYES2/CT foram digeridos individualmente com a enzima *EcoRI* a 37 °C, por três horas. A digestão do plasmídeo pYES2/CT incluiu adicionalmente a enzima fosfatase alcalina. Os fragmentos gênicos liberados dos plasmídeos de clonagem e o plasmídeo pYES2/CT linearizado foram purificados a partir de gel de eletroforese em agarose. O vetor linearizado (20 ng) foi incubado com uma quantidade equimolar de cada gene, a 4 °C por 16 h, na presença da enzima T4 DNA ligase. Uma alíquota da reação de ligação (5 μ L) foi utilizada para transformar células de *E. coli* DH5 α . Os plasmídeos recombinantes obtidos foram extraídos das bactérias transformadas pelo método de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSELL 2001) e analisados por digestão enzimática.

*Transformação da levedura *S. cerevisiae* com os plasmídeos recombinantes*

Células da cepa INVSc1 de *S. cerevisiae* foram transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-Arginase-I ou pYES2/CT-Arginase-II, utilizando a técnica descrita por GIETZ & WOODS, 2002.

Análise da expressão das enzimas

Uma colônia da levedura transformada contendo os plasmídeos pYES2/CT, pYES2/CT-Arginase-I ou pYES2/CT-Arginase-II foi transferida para 5 mL de meio CSM (Difco, EUA) sem uracila e cultivada a 30 °C por 18 h, a 100 rpm. Em seguida, uma alíquota de 500 μ L desta cultura foi utilizada para inocular 10 mL de meio YPG (extrato de levedura 1%, peptona 2% e galactose 2%) em frasco de penicilina de 50 mL. Os frascos foram incubados a 30 °C por 24 h, 100 rpm. As células foram

coletadas por centrifugação (1.800g, 5 min). Após lavagem com água destilada estéril, o sedimento obtido foi ressuspenso em 3 mL de tampão de ditioneitol (DTT) (Tris 100 mM, pH 9,0; DTT 10 mM) e incubado a 30 °C por 30 min, a 80 rpm. Em seguida, as células foram novamente coletadas por centrifugação (1.800g, 5 min) e ressuspenso em 7 mL tampão de zimolase (sorbitol 1,2 M, tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4). As células foram novamente coletadas por centrifugação (1.800 g, 5 min) e ressuspenso em 7 mL do mesmo tampão contendo zimolase (3 mg). As células foram incubadas a 30 °C por 6h, a 40 rpm. Após esta incubação, foi adicionado PMSF 1 mM e os esferoplastos foram lisados em homogeneizador tipo Dounce (15 movimentos). O homogeneizado foi centrifugado (1.800g, 5 min), e o sobrenadante, suplementado com $MnSO_4$ a 5 mM, foi utilizado para avaliação da atividade enzimática. As proteínas foram analisadas por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie.

Análise da atividade enzimática

O pH dos lisados celulares foi ajustado para 9,0, e as enzimas foram ativadas por incubação a 55 °C na presença de 5 mM de $MnSO_4$, seguido de resfriamento em banho de gelo. Aliquotas de 40 μ L do sobrenadante dos lisados celulares foram incubadas a 30 °C por 1 h com 160 μ L de arginina 50 mM em tampão Tris 50 mM, pH 9,3, contendo 2 mM de $MnSO_4$. As reações foram então fervidas em banho-maria por 5 min e alíquotas de 10 μ L das reações foram utilizadas para dosagem da ureia liberada com um kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Brasil). Nesse kit, a ureia é hidrolisada por urease, liberando íons amônio que, em pH alcalino, reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalítica do nitroprussiato de sódio, formando azul de indofenol, quantificado a 600 nm. Uma unidade de arginase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de ureia por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os plasmídeos de expressão pYES2/CT-Arginase-I e pYES2/CT-Arginase-II foram corretamente construídos, como evidenciado na análise de digestão com enzimas de restrição (Figura 1).

A análise da expressão das enzimas em células de *S. cerevisiae* transformadas mostrou que ambas foram expressas (Figura 2A), sendo a expressão da arginase I mais elevada, atingindo aproximadamente 4.200 unidades/10 mL de meio de cultura da levedura. Entretanto, o gel de SDS-PAGE não mostrou superexpressão de nenhuma proteína de aproximadamente 30 kDa (Figura 2B).

Esses resultados indicam que estudos futuros de otimização da expressão poderão ser realizados visando à avaliação de potenciais inibidores.

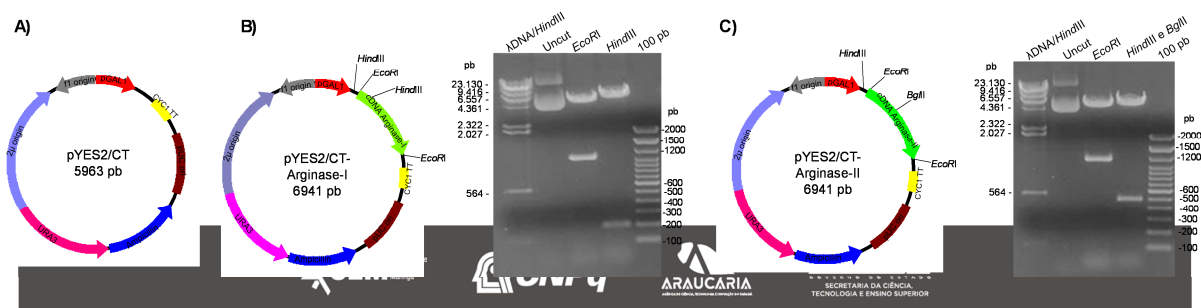


Figura 1 – Plasmídeos utilizados. A) Mapa do pYES2/CT. B) Mapa do pYES2/CT-Arginase-I e gel de agarose mostrando a análise de restrição correspondente. C) Mapa do pYES2/CT-Arginase-II e gel de agarose mostrando a análise de restrição correspondente.

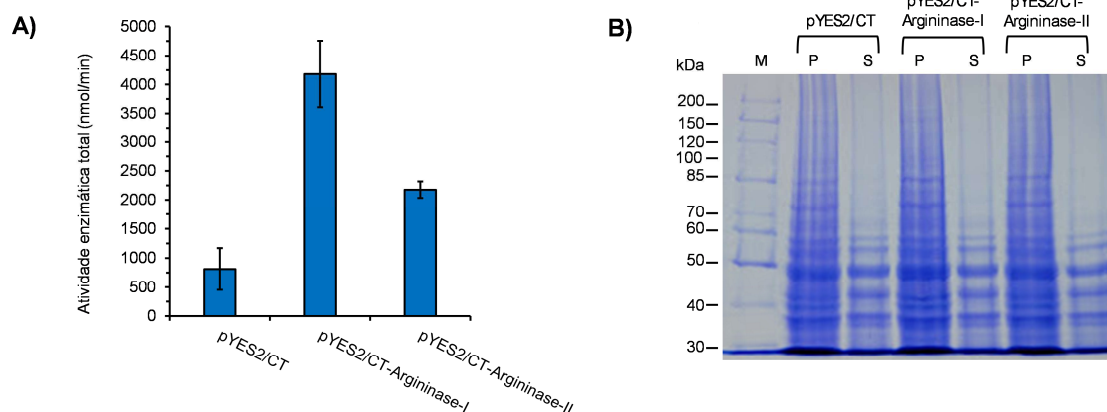


Figura 2 – Análise da produção recombinante das enzimas. A) Atividade enzimática no sobrenadante dos lisados celulares. Os dados representam a média e o desvio padrão de duplicatas. B) Gel de SDS-PAGE das proteínas presentes nos pellets (P) e sobrenadantes (S) dos lisados celulares.

CONCLUSÕES

Os plasmídeos de expressão foram construídos e utilizados para transformar a levedura *S. cerevisiae*. A expressão das enzimas foi detectada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária pela concessão da bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS

- GIETZ, D.R.; WOODS, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in Enzymology**, v 350, p. 87-96, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5).
- LI, Z.; WANG, L.; REN, Y.; HUANG, Y.; LIU, W.; LV, Z.; QIAN, L.; YU, Y.; XIONG, Y. Arginase: shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. **Cell Death Discovery**, v. 8, p. 413, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01200-4>.

PUDLO, M.; DEMOUGEOT, C.; GIRARD-THERNIER, C. Arginase inhibitors: A rational approach over one century. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, p. 475–513, 2017. [https://doi: 10.1002/med.21419](https://doi.org/10.1002/med.21419).

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Third edition. Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.