



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020026200-9 A2



(22) Data do Depósito: 21/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/07/2022

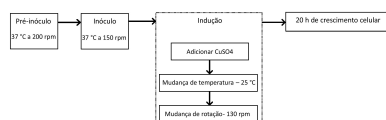
(54) **Título:** MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS

(51) **Int. Cl.:** C12N 9/02; C12N 15/53; C12N 15/63; C12N 15/74; C12P 1/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** NATÁLIA SARMANHO MONTEIRO LIMA; ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS. Trata-se de método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas para indústrias de celulose e papel, têxtil, bebidas e outros que necessitam de grandes quantidades dessas enzimas; dito método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas utiliza como meio para a indução Luria- Bertani - LB - e CuSO_4 para super expressão de oxidases multicópidas - MCOs.



“MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS”.**CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO**

[001] A presente patente de invenção trata de método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas para indústrias de celulose e papel, têxtil, bebidas e outros que necessitam de grandes quantidades dessas enzimas onde, notadamente, dito método utiliza do meio Luria- Bertani - LB - como meio para a indução dispensando o uso de isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo - IPTG - como indutor e a substituição deste por CuSO₄ para super expressão de oxidases multicópidas - MCOs - viabilizando redução de custos.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] A expressão de proteínas recombinantes tem sido um grande avanço, pois proporciona a produção dessas biomoléculas e a aumenta a facilidade de utilização destas nas mais diversas áreas da ciência. Entre os organismos mais utilizados como hospedeiros heterólogos para a expressão de proteínas estão, bactérias, leveduras e plantas.

[003] O meio Luria- Bertani (LB) é um dos mais usados para expressão de proteínas em bactérias, visto que é um meio complexo é possui todos os componentes necessários para o crescimento de Escherichia coli, amplamente utilizado produção de proteínas em bactérias. A expressão utilizando este meio, bem como outros para crescimento bacteriano (colocar aqui exemplos), necessita da adição do indutor, que por sua vez é o isopropil- β -D-1-galactosídeo (IPTG).

[004] O isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo - IPTG é um composto caro e as vezes tóxico para a célula hospedeira. Muitas vezes o excesso de isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo – IPTG - no meio, causa problemas na expressão, solubilidade e purificação de proteínas.

[005] Outra forma de expressão que não requer a utilização de um indutor é utilizando meios de auto-indução. As oxidases são enzimas com as mais diversas funções, estas catalisam reações de oxi-redução. Dentro deste grupo de enzimas existe um outra grande grupo, chamado de Multicopper oxidases, ou seja, oxidases dependentes do cobre, nesta existem três centros de cobre, onde a este se liga, fazendo parte

estruturalmente das oxidases multicópidas - MCOs. Este grupo inclui as lacases, ceruplasmin, nitrito redutase, ascorbato redutase e bilirubin oxidases.

[006] O artigo científico intitulado como '*Copper induction and differential expression of laccase in Aspergillus flavus*' (2015) / Indução de cobre e expressão diferencial de lacase em '*Aspergillus flavus*' e publicado na Revista Brasileira de Microbiologia Versão para impressão ISSN 1517-8382 versão on-line ISSN 1678-4405 revela que '*Aspergillus flavus*' foi isolado do solo e exibiu atividade de lacase em condições constitutivas e induzidas por cobre. A adição de sulfato de cobre 1 mM ao meio resultou em um aumento na atividade que atingiu 51,84 U/mL, uma banda de proteína distinta foi detectada a 60 kDa. A enzima extracelular foi purificada 81 vezes por cromatografia de filtração em gel e resultou em duas frações de lacase diferentes L1 e L2, esta última com maior atividade enzimática que atingiu 79,57 U / mL e atividade específica de 64,17 U / µg proteína. A análise do espectro da fração L2 mostrou um ombro em 330 nm que é característico dos centros de cobre T2 / T3; foram detectados cobre e zinco, sugerindo que esta é uma lacase branca não convencional. Os iniciadores do gene da lacase foram projetados e sintetizados para recuperar o gene específico de '*A. flavus*'. A análise da sequência indicou lacase putativa (Genbank ID: JF683612) ao nível do aminoácido, sugerindo uma identidade próxima às lacases de outros gêneros contendo o local de ligação de cobre. A descoloração de águas residuais têxteis em diferentes condições mostrou possível aplicação em biorremediação em um curto período de tempo. O efeito do cobre em '*A. flavus*' foi dependente da concentração.

[007] O artigo científico intitulado como '*Heterologous expression of laccase cDNA from Ceriporiopsis subvermispora yields copperactivated apoprotein and complex isoform patterns*' (2003)/ A expressão heteróloga de cDNA de lacase de Ceriporiopsis subvermispora produz apoproteína ativada por cobre e padrões de isoforma complexos publicado pela primeira vez : 01 de maio de 2003 <https://doi.org/10.1099/mic.0.26147-0> revela que a análise de clones genômicos que codificam uma lacase putativa em cepas de *homokaryon* de Ceriporiopsis subvermispora levou à identificação de uma variante alélica do gene lcs-1 previamente descrito . Um clone de cDNA correspondente a este gene foi expresso em *Aspergillus nidulans* e em *Aspergillus niger*. Ensaio enzimáticos e

Western blots mostraram que ambos os hospedeiros secretavam lacase ativa. Em relação às formas isoζímicas da enzima *C. subvermispora* nativa, a lacase produzida por *A. niger* tinha uma massa molecular mais alta e deu uma única banda em géis IEF. Em contraste, *A. nidulans* transformantes secretaram várias isoformas notavelmente semelhantes às do sistema nativo. Considerado juntamente com Southern blots relatados anteriormente e sequenciamento de proteínas, a expressão em *A. nidulans* apóia a visão de que *C. subvermispora* tem um único gene de lacase e que várias isoformas resultam de processos pós-tradução. Além disso, várias linhas de evidência sugerem fortemente que sob a limitação de cobre, *A. nidulans* secreta apoproteína que pode ser reconstituída por uma curta incubação com Cu (I) e em menor extensão com Cu (II).

[008] Já o documento de nº. US20020039772 revela um método para aumentar a recuperação da enzima ativa produzida em uma planta é fornecido quando a enzima requer um cofator metálico de transição para ativação. O cofator metálico é fornecido à enzima durante o desenvolvimento da planta, durante a extração ou após a extração. A recuperação da enzima ativa também é fornecida pela incubação da enzima extraída a uma temperatura não degradante da enzima. A adição de um sal de íon negativo melhora ainda mais a recuperação da enzima ativa. São fornecidas concentrações ideais de sal para recuperação de lacase de plantas usando soluções de cobre.

[009] Os artigos apresentados são de organismos eucarióticos, bem como, o documento de nº. US20020039772 relata estudos em uma planta citando o uso do cobre como cofator e não como indutor, distinto do pedido ora requerido, sendo que, o mesmo ocorre para as demais anterioridades, onde o cobre é usado apenas como suplementação.

[010] É de conhecimento que a expressão gênica pode ocorrer de duas formas, constitutiva e indutiva. Nos artigos citados utilizando principalmente fungos, em sua maioria ela é constitutiva, ou seja, irá ocorrer normalmente, já que o organismo tem promotores que permitem a expressão. No caso de proteínas heterólogas, e no caso da patente requerida em que a necessidade de vetor de expressão e este tem um promotor o qual necessita ser induzida para que a expressão ocorra, é denominada de expressão

indutiva. Afunilando para expressão heteróloga em procariotos, os vetores possuem um promotor que é ativado por lactose, o isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo – IPTG -, como citado, é um análogo a lactose. Sendo assim a expressão só ocorrerá na presença deste.

[011] Dessarte, a proposta da invenção não é suplementar ou adicionar cofator, e sim usar o cobre como indutor, ou seja, sem uso de lactose ou qualquer análogo. O isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo - IPTG - não será adicionado em momento algum. Lembrando que este é um reagente de alto valor monetário, e a invenção ora inovada visa apresentar uma nova alternativa de "Expressão de proteínas oxidativas heterólogas em procariotos" principalmente os transformados em '*Escherichia coli*'.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção trata-se da utilização do meio Luria- Bertani - LB - como meio para a indução, sem a necessidade da utilização de IPTG como indutor e a substituição deste por CuSO₄ para super expressão de oxidases multicópidas - MCOs. É um método que pode ser utilizado por MCOs recombinantes substituindo o IPTG por menos de 0,5 mM de CuSO₄.

[013] É objetivo da invenção apresentar método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas que compõe um método alternativo para super expressar proteínas oxidativas recombinantes com custo reduzido e prático de executar.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[014] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, uma figura, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[015] a figura 1 representa uma vista do diagrama de blocos das etapas que compõe o método ora inovado.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente patente de invenção se refere à "MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS", mais precisamente trata-se de método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas para indústrias de celulose e papel, têxtil, bebidas e

outros que necessitam de grandes quantidades dessas enzimas.

[016] Segundo a presente invenção, método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas utiliza como meio para a indução Luria- Bertani - LB - e CuSO_4 para super expressão de oxidases multicópidas - MCOs - e compreende as seguintes etapas:

- i) Isolamento de amostras de diferentes ambientes de '*Multicopper Oxidases*'/ oxidases multicópidas - MCOs heterólogas;
- ii) Clonagem dos genes das proteínas heterólogas em vetores de expressão pET28 a e pHAT2 para a produção do DNA recombinante. O produto da ligação (vetor+inserto/*Open Reading Frame*-ORF/ Fase de leitura aberta) são transformadas em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) por choque térmico;
- iii) As células transformadas são inoculadas em meio Luria Bertani (LB) -sólido acrescido com antibiótico recomendado para o vetor utilizado, e após 16 horas as células são coletadas. A confirmação da clonagem é feita por PCR de colônia e/ou sequenciamento;
- iv) Após a confirmação um clone positivo de cada construção é inoculado em LB-líquido para o crescimento celular, sendo feito um pré-inóculo em meio LB-líquido crescido em 37 °C a 200 rpm em agitador orbital refrigerado e 5% deste foi adicionado ao inóculo. O crescimento do inóculo se deu em agitador orbital refrigerado nas condições de 37 °C a 150 rpm, assim que alcançou a densidade ótima requerida é adicionado ao meio o CuCO_4 ;
- v) As condições de crescimento foram alteradas para 25 °C e 130 rpm. Para visualização da expressão proteica, amostras de determinados tempos foram analisadas em gel SDS-PAGE 10%.

[017] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS”**, mais precisamente trata-se de método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas para indústrias de celulose e papel, têxtil, bebidas e outros que necessitam de grandes quantidades dessas enzimas; caracterizado por método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas compreender as etapas:

i) isolamento de amostras de diferentes ambientes de ‘Multicopper Oxidases’/ oxidases multicópidas - MCOs heterólogas;

ii) clonagem dos genes das proteínas heterólogas em vetores de expressão pET28 a e pHAT2 para a produção do DNA recombinante; o produto da ligação (vetor+inserto/Open Reading Frame-ORF/ Fase de leitura aberta) são transformadas em células de Escherichia coli BL21(DE3) por choque térmico;

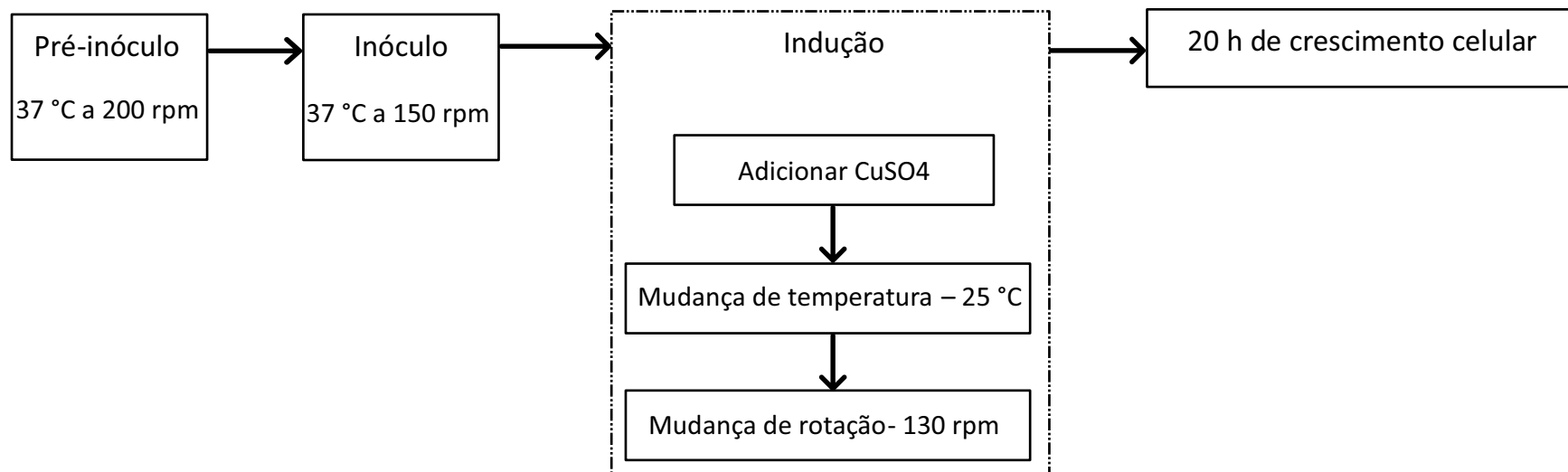
iii) as células transformadas são inoculadas em meio Luria Bertani (LB) -sólido acrescido com antibiótico recomendado para o vetor utilizado, e após 16 horas as células são coletadas; a confirmação da clonagem é feita por PCR de colônia e/ou sequenciamento;

iv) após a confirmação um clone positivo de cada construção é inoculado em LB-líquido para o crescimento celular, sendo feito um pré-inóculo em meio LB líquido crescido em 37 °C a 200 rpm em agitador orbital refrigerado e 5% deste foi adicionado ao inóculo; o crescimento do inóculo se deu em agitador orbital refrigerado nas condições de 37 °C a 150 rpm, assim que alcançou a densidade ótima requerida é adicionado ao meio o CuCO_4 ; e

v) as condições de crescimento foram alteradas para 25 °C e 130 rpm.

2) **“MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas utilizar como meio para a indução Luria- Bertani - LB - e CuSO_4 para super expressão de oxidases multicópidas - MCOs.

FIG.1



RESUMO

“MÉTODO DE EXPRESSÃO PARA ENZIMAS OXIDATIVAS HETERÓLOGAS”.

Trata-se de método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas para indústrias de celulose e papel, têxtil, bebidas e outros que necessitam de grandes quantidades dessas enzimas; dito método de expressão para enzimas oxidativas heterólogas utiliza como meio para a indução Luria- Bertani - LB - e CuSO_4 para super expressão de oxidases multicópidas - MCOs.