

Clonagem e caracterização do gene *ftsH* de *Streptomyces cerradoensis* em células de *Escherichia coli* AR3291 e XL1-blue

SANTOS, Lorena Cristina¹ e BATAUS, Luiz Artur Mendes².

Palavras-Chave: proteínas, FtsH, SecY, std

Introdução:

A FtsH (filamentação sensível à temperatura, Santos e Almeida, 1975) é uma metaloprotease ATP e Zn^{2+} dependente, pertencente à família AAA (ATPases Associadas a diversas Atividades celulares). Ela está relacionada com várias funções celulares, que vão desde a degradação de proteínas que não estão na sua forma correta ou reunidas adequadamente até como chaperones moleculares (Schumann, 1999). Encontra-se ligada à membrana celular desempenhando diversas atividades celulares (Tomoyasu *et al.*, 1995). É encontrada desde procariotos até eucariotos em associação a cloroplastos e mitocôndrias (Schumann, 1999).

É sabido, ainda, que a FtsH inicia um papel central na degradação de proteínas de membrana instáveis. Ela degrada SecY, uma subunidade da maquinaria de secreção e a subunidade Fo da ATP sintase subunidade a quando elas estão livres no citoplasma. Ela ainda degrada YccA, a qual a função não se sabe, e algumas proteínas citosólicas instáveis. (Sakoh *et al.*, 2005),

O presente projeto estuda a expressão do gene *ftsH* de *Streptomyces cerradoensis* em linhagens de *Escherichia coli* XL1-blue, AR3291, AR3289 e XL-gold, e análise da atividade da proteína FtsH nas mesmas. A fim de um maior conhecimento do papel desempenhado pela proteína FtsH que poderá resultar numa melhor compreensão das funções celulares desempenhadas por ela, o que resultaria num melhor conhecimento a respeito dos organismos em que ela está presente.

Nós obtivemos a clonagem parcial do gene *ftsH* de *Streptomyces cerradoensis*. O gene clonado apresenta uma homologia muito grande com o gene de *Streptomyces coelicolor*. Esse gene codifica uma proteína que apresenta atividade biológica em células de *E. coli* da linhagem AR3291. Essas células são mutantes que sofreram uma deleção do gene *ftsH* e que apresentam uma baixa eficiência biológica quando cultivadas a uma temperatura de 37°C (Naberhaus *et al.*, 1999).

Contudo, para uma melhor caracterização do gene *ftsH* e sua proteína, realizamos uma complementação dos estudos, utilizando as linhagens AR3289, XL-gold e XL1-blue

Metodologia:

Para a análise da expressão da proteína FtsH em células de *E. coli* AR3291, AR3289, XL1-blue e XL-gold, estas foram transformadas com os plasmídeos pUC18 e pFS9, por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). As células transformadas foram inoculadas em meio LB e incubadas sob agitação para leitura da absorbância em espectrofotômetro, para a obtenção da curva de crescimento. Para análise do perfil das proteínas das células XL1-blue contendo os plasmídeos pUC18 e pFS9, foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Para obtenção do fenótipo std, clones foram palitados em placas de Petri com meio Agar-Lúria contendo X-Gal e X-Gal+IPTG e incubados por 16-18hs a 37°C.

Resultados e Discussões

Curva de crescimento das linhagens XL1-blue, XL-gold, AR3289 e AR3291 transformadas com os plasmídeos pUC18 e pFS9: Durante o período de crescimento analisado foi possível notar que nas linhagens XL-gold e AR3289 quando transformadas com o plasmídeo pUC18 tiveram um crescimento significativamente melhor que quando transformadas com o pFS9. Já nas linhagens XL1-blue e AR3291 as células tiveram um melhor crescimento quando transformadas com o plasmídeo pFS9. O resultado encontrado para células XL1-blue é contrário ao descrito na literatura já que estas contêm o gene *ftsH* normal. Aparentemente a expressão do gene *ftsH* resulta em algum tipo de vantagem para essa linhagem.

Contudo, os resultados obtidos para as células AR3291 foram esperados, já que quando transformadas com o plasmídeo pFS9 obtiveram um crescimento superior ao apresentado quando esta contém o plasmídeo pUC18. O que entra de acordo com os trabalhos realizados por Naberhaus, (1999), onde a proteína heteróloga produzida pelo gene *ftsH* de *Bradyrhizobium japonicum* complementa a mutação em *ftsH* nas células AR3291.

Caracterização do fenótipo de translocação de proteínas citoplasmáticas para o meio de cultura das células *E. coli* XL1-blue, XL-gold, AR3289 e AR3291: Para verificar se a proteína produzida por pFS9 complementava a mutação para o fenótipo Std, células XL1-blue, AR3289 e AR3291 foram analisadas. Esse fenótipo de extravasamento de proteínas citoplasmáticas para o meio de cultura é resultado do acúmulo de SecY nas células deficientes de FtsH, já que quando esta está presente degrada-a.

Na análise dos resultados obtidos, observou-se que quando transformadas com o plasmídeo pFS9, as linhagens AR3289 e AR32291, houve a indução da síntese de proteínas, porém não apresentaram o fenótipo std, indicando a atividade catalítica da proteína produzida pelo gene *ftsH* presente no plasmídeo pFS9. Já a linhagem XL1-blue apresentou produção e extravasamento de proteínas apenas quando continha o plasmídeo pUC18.

Análise da expressão das proteínas produzidas por células de *Escherichia coli* XL-gold transformadas com os plasmídeos pFS9 e pUC18: A análise do gel de poliacrilamida demonstrou diferença no perfil de proteínas produzidas quando a célula foi cultivada em presença ou ausência de IPTG. Entretanto não foi possível detectar a banda correspondente à proteína FtsH. Tal fato, possivelmente, se deu devido à restrição de informações que uma

eletroforese unidimensional dá quando temos baixa quantidade de proteínas. Para estudar melhor a expressão dessa proteína induzida por IPTG, será necessário realizar uma avaliação através de eletroforese bidimensional, pois através desta, esperamos poder visualizar o spot correspondente à proteína FtsH.

Bibliografia

NARBERHAUS, F.; URECH, C.; HENNECKE, H. Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum ftsH* gene and its product. J. Bacteriol., 181(23):7394-7, 1999.

SAKOH, M.; ITO, K. & AKIYAMA, Y. Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *E. coli*. JBC Papers in Press. 2005 Manuscript M506180200

SANTOS, D. e ALMEIDA, D.F. Isolation and characterization of a new temperature-sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 1975 Dec; **124**(3):1502-7.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning – A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SCHUMANN, W. FtsH--a single-chain charonin FEMS Microbiol. Rev., 23(1):1-11, 1999.

TOMOYASU T., ARSENE F., OGURA B. (2001) The C terminus of sigma³² is not essential for degradation by FtsH. J Bacteriol Oct; 193 (20):5911-7.

Apoio: CNPq e FUNAPE

¹Bolsista de Iniciação Científica- Instituto de Ciências Biológicas -ICBII- Departamento de Ciências Fisiológicas- Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética, lorenacsantos@yahoo.com.br

²- Orientador/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, bataus@icb.ufg.br