

Expressão heteróloga de monoxigenases de polissacarídeos bacterianas em *Pichia pastoris*

Fernanda Pinheiro dos Santos¹, Kelly Barreto Rodrigues², Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴, Léia Cecília de Lima Fávoro⁵, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

A descoberta das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs), que agem em sinergismo auxiliando outras enzimas na degradação da celulose, gerou um grande interesse da comunidade científica em relação às pesquisas voltadas principalmente para produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. A busca por essas proteínas auxiliares em microrganismos surgiu como uma estratégia promissora, pois há grande diversidade de isoformas e disponibilidade de sequências genômicas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a expressão de LPMOs de origem bacteriana utilizando o sistema de expressão da levedura *Pichia pastoris*. Foram obtidos clones de *P. pastoris* transformados com todos os seis genes candidatos, porém apenas o gene referente a LPMO de *Thermobifida fusca* YX obteve sucesso na expressão.

Introdução

A produção de energia renovável derivada de biomassa é uma alternativa para reduzir o uso intensivo de combustíveis fósseis e para diversificar e garantir o suprimento de energia no futuro. No entanto, a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (etanol 2G ou de segunda geração) depende do desenvolvimento de tecnologias para exploração eficiente dos componentes da parede celular vegetal.

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, fernanda.pinheiro@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, kellybiobarreto@gmail.com.

³ Bacharel em Biotecnologia, mestrando em Biociência, Universidade Federal da Bahia, marcio.santana@colaborador.embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

A recalcitrância da celulose é um dos fatores limitantes para a hidrólise enzimática e impõe a necessidade de adição de elevada carga de enzimas hidrolíticas (LEE et al., 2009). Portanto, novas enzimas que tornem a sacarificação mais eficiente tem sido buscadas. Nesse contexto, a descoberta das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) revolucionou o conhecimento sobre a degradação enzimática da celulose e atualmente é aceito que essa degradação inclui componentes com ação hidrolítica e oxidativa.

As monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) são uma importante classe de enzimas auxiliares, as quais agem sinergicamente com celulases, aumentando a eficiência e diminuindo os custos da etapa de sacarificação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a expressão de LPMOs bacterianas na levedura *P. pastoris*.

Materiais e métodos

Seleção de monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs) bacterianas a partir de banco de dados

A partir da base de dados de domínio público CAZY (Carbohydrate-Active enZymes Database) e de literatura específica, foram selecionados seis genes codificadores para enzimas monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs) de diferentes bactérias, sendo eles: gene 1(F1), gene 2(F2), gene 3 (F3), gene 4 (F4), gene 5 (F5) e gene 6(F6).

A base de dados de domínio público NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para obter as sequências proteicas e nucleotídicas. Após análise *in silico* a sequência do peptídeo sinal nativo para secreção das proteínas foi retirada dos genes selecionados, uma vez que se optou por utilizar a sequência sinal de secreção (denominado α -factor, nativa de *Saccharomyces cerevisiae*) existente no vetor de *Pichia pastoris*, pPICZ α A (Life Technologies) (Figura 1). Após a remoção, foi necessário fazer análise desses genes modificados, de forma a garantir a integridade do *frame* das construções após subclonagem no vetor final (pPICZ α A). Nessa etapa, também foram inseridos dois sítios de restrição: um para a enzima *EcoRI* (extremidade 5') e outro para *XbaI* (extremidade 3'). As construções foram analisadas utilizando o programa Geneious versão 7.1.8., e dois nucleotídeos foram adicionados antes do sítio da enzima de restrição *XbaI*,

com o objetivo de manter as construções em *frame* (tradução correta das proteínas).

As sequências foram submetidas e otimizadas na plataforma GeneArt (Life Technologies), para expressão em *Pichia pastoris*.

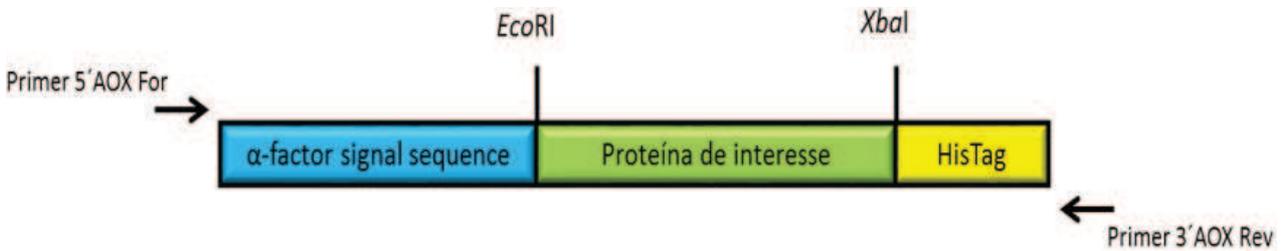


Figura 1. Representação esquemática das clonagens em *P. pastoris*.

Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação com os genes codificadores de LPMOs bacterianas

Para a transformação de *E. coli*, foram utilizados 2 μL de DNA, na concentração de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). Foram selecionadas duas colônias transformadas de cada gene, que foram inoculadas em meio LB ágar contendo Zeocina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

Para confirmar se as construções continham o gene de interesse, o DNA plasmidial extraído de *E. coli* foi analisado por padrão de restrição, utilizando os sítios de restrição selecionados para a síntese das sequências (*EcoRI* na extremidade 5' e *XbaI* na extremidade 3'). Para as restrições, foram utilizados os seguintes reagentes: tampão - Promega, 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA, *EcoRI* 15U/ μL - Invitrogen, *XbaI* 12 U/ μL - Promega e água destilada para um volume final de 10 μL .

Transformação de *P. pastoris* por eletroporação com os genes codificadores de LPMOs bacterianas e seleção de clones positivos

Após a confirmação das construções por padrão de restrição, as colônias transformadas de *E. coli* selecionadas foram inoculadas em meio LB contendo 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Zeocina. A extração de DNA foi realizada utilizando kit comercial 'QIAGEN Plasmid Midi Kit' (Qiagen), obtendo-se quantidade suficiente de DNA para linearizar e purificar os plasmídeos para a transformação em *Pichia pastoris*.

De acordo com o manual que foi utilizado para transformação (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit - Invitrogen) (INVITROGEN, 2010), os plasmídeos devem ser

linearizados para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura e as enzimas que podem ser utilizadas para linearizar o vetor pPicZαA são *Pme* I e *Sac* I. Portanto, os plasmídeos contendo os genes 1 (F1), 3 (F3), 4 (F4), 5 (F5) e 6 (F6) foram linearizados com a enzima *Sac* I e o plasmídeo contendo o gene 2 (F2) foi linearizado com a enzima *Pme* I. O protocolo seguido para a restrição dos plasmídeos fez uso dos seguintes reagentes: tampão *Sac* I 10X, 3-5 µg de DNA, *Sac* I ou *Pme* I 10 U/µL e água destilada para um volume final de 10 µL.

Os plasmídeos previamente linearizados foram então purificados por precipitação com etanol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Células eletrocompetentes da linhagem X-33 de *P. pastoris* foram transformadas por eletroporação e incubadas a 30 °C por 48 a 72 horas em meio YPD contendo Zeocina (100 µg/µL). Depois do crescimento dos transformantes de *P. pastoris*, foi feita a lise das leveduras, utilizando o protocolo adaptado do manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. O DNA genômico de *P. pastoris* foi diretamente utilizado como molde em reações de PCR (*polymerase chain reaction*). Para tanto, foram utilizados *primers* específicos que flanqueiam as regiões 5'e 3' do promotor *AOX1*. O gene *AOX1* é responsável pela maior parte da atividade álcool oxidase da célula. A recombinação homóloga no genoma de *Pichia* pode ocorrer de duas formas: na região do promotor *AOX2*, o que resulta na redução da capacidade das células para metabolizar metanol, resultando em uma linhagem denominada Mut^S (*Methanol utilization slow*); ou na região do promotor *AOX1*, que confere aos transformantes a capacidade de metabolizar metanol como única fonte de carbono e resulta em células capazes de crescerem bem em meio com metanol. Essas células são denominadas Mut⁺ (*Methanol utilization plus*). Uma vez que a linhagem utilizada para a transformação foi a selvagem X-33, espera-se o padrão Mut⁺, que é caracterizado, após a PCR, pela visualização de duas bandas com os tamanhos de 2.200 pb e o tamanho do gene mais 588 pb, provenientes do vetor.

Cada reação de PCR para confirmação da inserção dos genes no genoma de *P. pastoris* continha: 1X de 10X PCR Rxm Buffer (-MgCl₂) (Invitrogen), 3,7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs 10mM (Invitrogen), 0,8 mM de *primer* 5'AOX1 Forward, 0,8 mM de *primer* 3'AOX1 Reverse, 5-20 ng de DNA, 1,0 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água destilada para um volume final de 25 µL. Para a amplificação foi utilizada uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento do primer a 54 °C

por 30 segundos e extensão a 72 °C por 4 minutos. A extensão final foi a 72 °C por 10 minutos.

Indução por metanol dos clones de *P. pastoris* contendo os genes de LPMOs bacterianas

Uma colônia de cada transformante de *P. pastoris* foi inoculada em 25 mL de meio BMGY e incubada a 30 °C sob agitação de 250 rpm, até atingir uma OD₆₀₀ de 2 a 6. Ao mesmo tempo, foi utilizado como controle da expressão e de *backgorund* um clone de *P. pastoris* transformado com vetor pPicZαA sem inserto.

As células foram então coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 50 mL de meio BMMY, obtendo-se uma OD₆₀₀ final de 1.0. As mesmas foram transferidas para erlenmeyers e novamente incubadas a 30 °C sob agitação de 250 rpm.

A cada 24 horas, foi adicionado metanol 100% a uma concentração final de 0,5% para manter a indução dos transformantes. Durante 72 horas de indução, foram coletadas alíquotas de 1 mL em tubos de 1,5 mL a cada 24 horas. Essas foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. Tanto o pellet quanto o sobrenadante foram armazenados em freezer -80 °C para posterior análise por SDS-PAGE e Western Blot.

Análise das proteínas expressas em *P. pastoris* por SDS-PAGE e Western Blot

Após a indução, as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% e Western Blot, para o qual foi utilizado o anticorpo Anti-HisTag (Sigma), uma vez que todas as proteínas foram clonadas *in frame* com a cauda de histidina existente no vetor pPICZαA (Figura 1). O SDS-PAGE e o Western Blot foram realizados de acordo com o protocolo de Sambrook e Russel (2001).

Resultados e discussão

O resultado da restrição do DNA plasmidial extraído de *E. coli* foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%, onde foram visualizados fragmentos de DNA correspondentes aos tamanhos dos genes sintetizados (Figura 2), um do tamanho

esperado do vetor (3.000 pb) e o outro dos fragmentos clonados (aproximadamente 500 pb), confirmando que os plasmídeos possuem o gene de interesse. Dessa forma, pôde-se dar início à transformação de leveduras com esses plasmídeos.

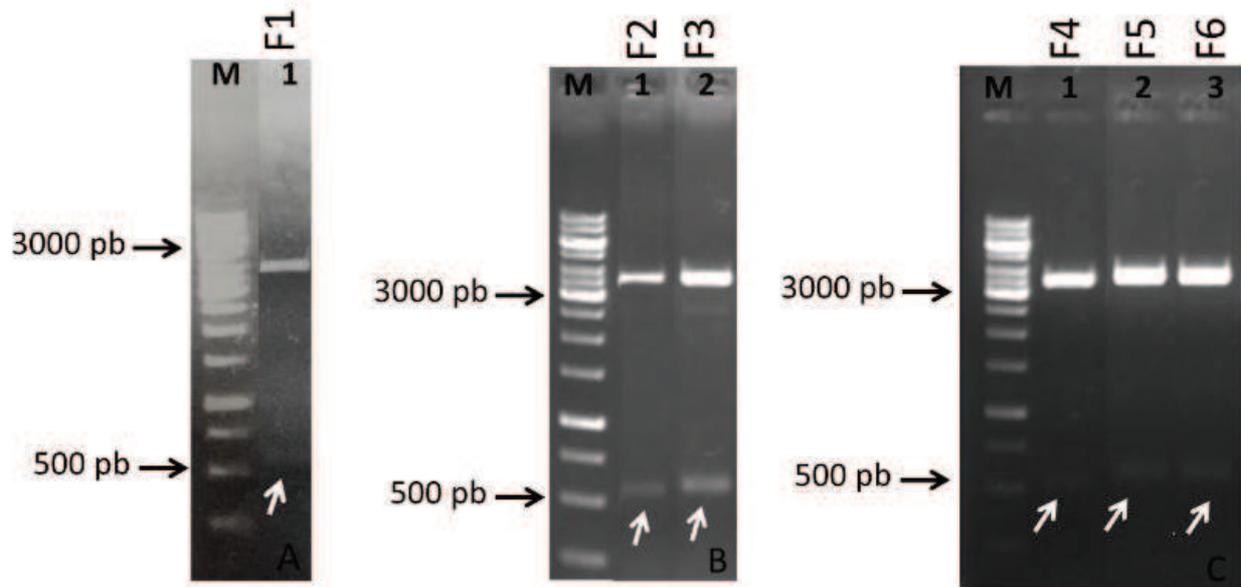


Figura 2. Padrão de restrição do DNA plasmidial obtido com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI. Em (A) poço 1: gene 1 (F1); (B) poço 1: gene 2 (F2), poço 2: gene 3 (F3); (C) poço 1: gene 4 (F4), poço 2: gene 5 (F5) e poço 3: gene 6 (F6). As setas indicam o tamanho dos fragmentos de DNA esperados.

M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Os plasmídios selecionados foram então linearizados com as respectivas enzimas de restrição (Figura 3), sendo observado que o tamanho do plasmídeo tratado com enzima de restrição (linearizado) estava diferente do não tratado (íntegro), indicando que ocorreu a linearização. Após a preparação do DNA linearizado, leveduras *P. pastoris*, linhagem X-33, foram então transformadas.

Para avaliar a integração dos genes de interesse no genoma de *P. pastoris*, foi realizada a PCR, cujos produtos de amplificação podem ser visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme a Figura 4.

De acordo com o manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, quando o padrão de amplificação esperado é Mut⁺, devem ser visualizados dois fragmentos após a PCR: um de aproximadamente 2.200 pb, que corresponde ao gene *AOX1*, e o outro do tamanho do gene de interesse mais 588 pb (no caso do vetor pPICZαA), provenientes do vetor.

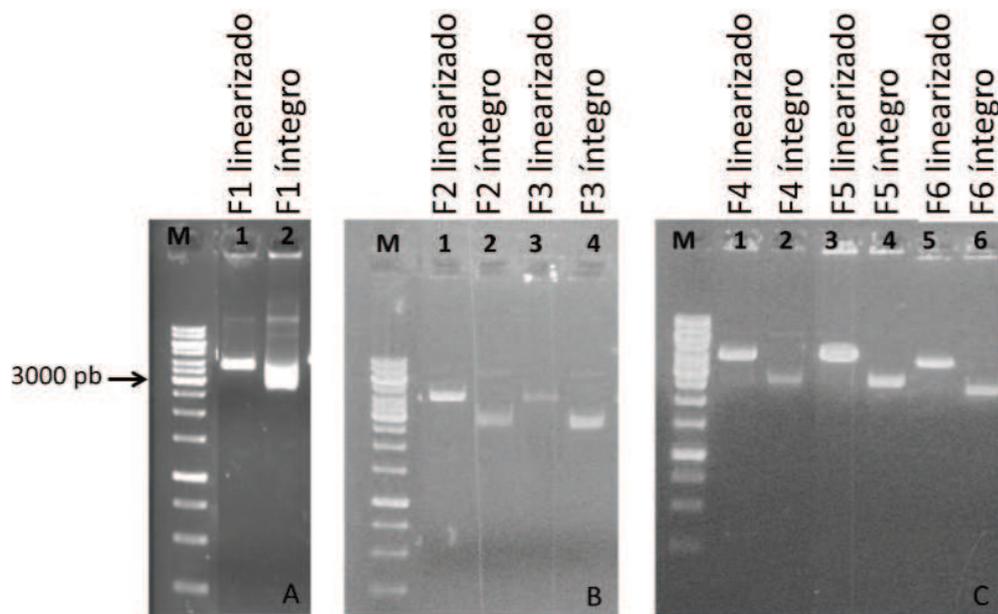


Figura 3. Plasmídeos digeridos (linearizados) e íntegros, respectivamente. Em (A) poço 1 e 2: gene 1 (F1); (B) poço 1 e 2: gene 2 (F2), poço 3 e 4: gene 3 (F3); (C) poço 1 e 2: gene 4 (F4); poço 3 e 4: gene 5 (F5) e poço 5 e 6: gene 6 (F6). M- Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Todos os clones de *P. pastoris* estudados no presente trabalho, que apresentam genes codificadores para LPMOs bacterianas, apresentaram o padrão Mut⁺, e esses clones foram submetidos a indução por metanol.

Alíquotas das amostras retiradas durante a indução foram utilizadas para a análise da expressão das proteínas por SDS-PAGE e Western Blot, que podem ser visualizadas na Figura 5. Essa análise confirma a expressão da LPMO de *Thermobifida fusca*, a qual está fusionada com cauda de histidina.

No entanto, não houve detecção das demais LPMOs bacterianas clonadas em *P. pastoris* até o momento. Possivelmente, estas não estão sendo secretadas de forma efetiva para o meio ou o metanol, utilizado na indução dos clones de *Pichia*, provavelmente pode ser tóxico à levedura na concentração utilizada, prejudicando a expressão das proteínas.

A partir desses resultados, novas induções serão realizadas, com base em outras referências, como Wang e colaboradores (2014), os quais testaram diferentes concentrações de metanol e soluções que inibem a ação das proteases, enzimas que podem degradar as proteínas durante o processo de purificação.

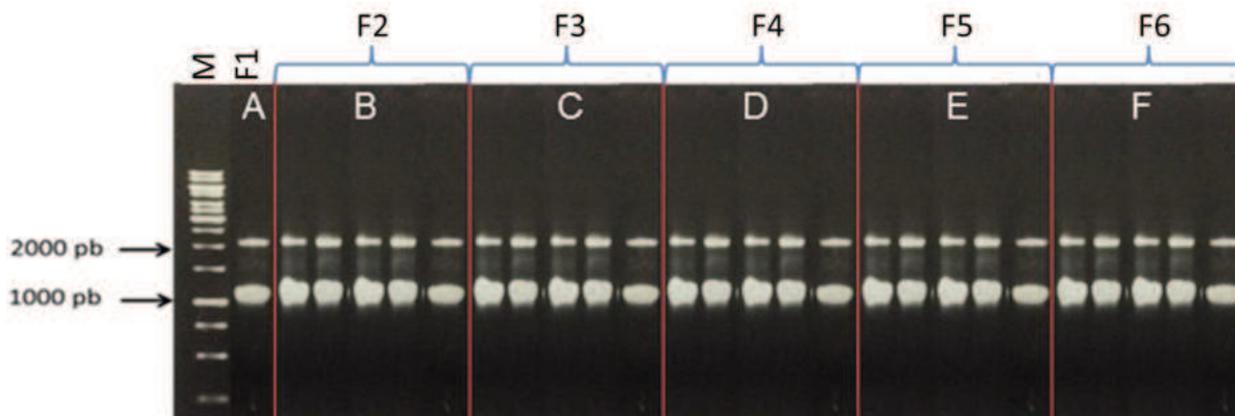


Figura 4. Avaliação por PCR da integração dos genes de interesse no genoma de *P. pastoris*. Em (A): um clone de *P. pastoris* contendo o gene 1 (F1); (B): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 2 (F2); (C): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 3 (F3); (D): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 4 (F4); (E): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 5 (F5) e (F): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 6 (F6). M - Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

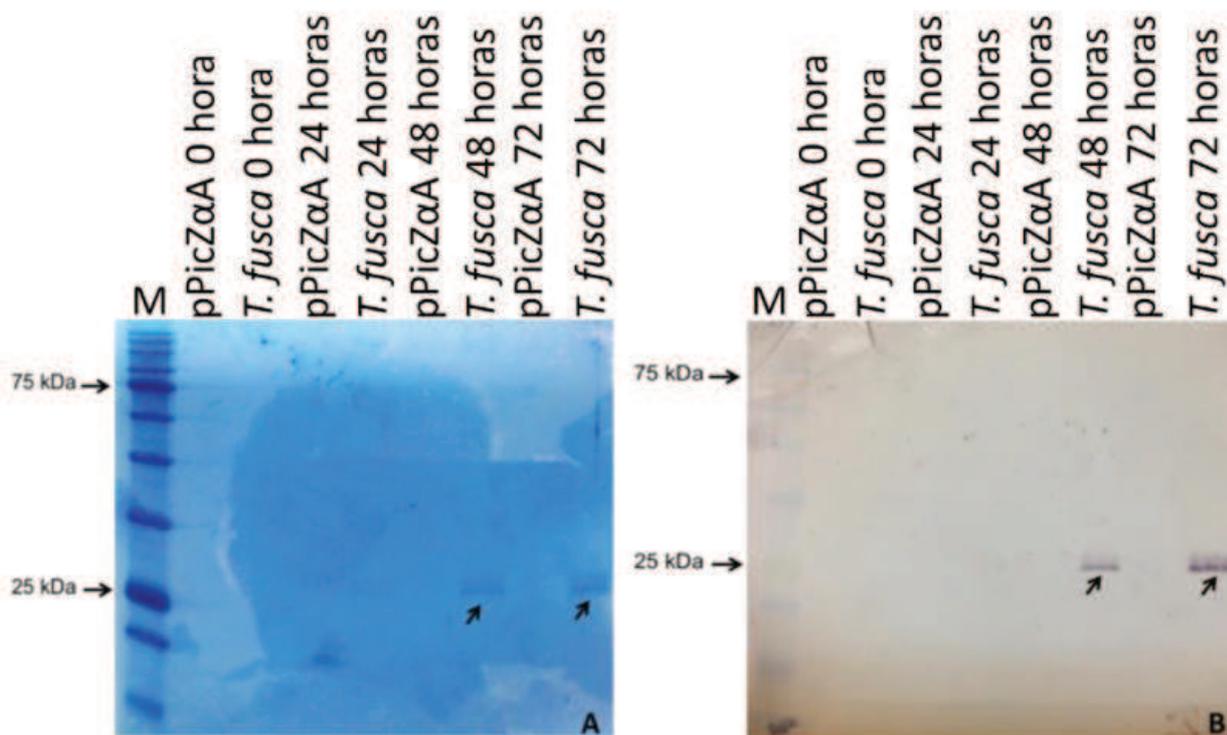


Figura 5. SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol da LPMO de *Thermobifida fusca* YX. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue (B) – Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-HisTag. M – Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

Conclusão

A análise da expressão de proteínas confirmou a expressão apenas da enzima LPMO de *Thermobifida fusca* YX. Todos os clones de *P. pastoris* contendo os novos genes de LPMOs bacterianas analisados até o momento apresentaram o padrão Mut⁺ e serão, portanto, novamente induzidos por metanol e avaliados quanto à expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos da Embrapa (Projeto UPZYME) e BNDES.

Referências

INVITROGEN. **EasySelect™ Pichia Expression Kit**: for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Carlsbad, CA, 2010. Cat. no. K1740-01; Manual part no. 25-0172; MAN0000042.

LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic Liquid: mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 102, n. 5, p. 1368-1376, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

WANG, W.; LIU, C.; MA, Y.; LIU, X.; ZHANG, K.; ZHANG, M. H. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 84, p. 16–27, 2014.