

# Clonagem e expressão de genes de monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) de fungos em *Pichia pastoris*

Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana<sup>1</sup>, Kelly Barreto Rodrigues<sup>2</sup>, Fernanda Pinheiro dos Santos<sup>3</sup>, Thaís Demarchi Mendes<sup>4</sup>, Mônica Caraméz Triches Damaso<sup>5</sup>, Léia Cecília de Lima Fávaro<sup>6</sup>, Félix Gonçalves de Siqueira<sup>7</sup>

## Resumo

Um dos grandes desafios no processo de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis é a obtenção de coquetéis enzimáticos com alta eficiência, para atuação no processo de hidrólise enzimática. O conceito clássico de que a degradação da celulose e de outros polissacarídeos na natureza é um processo hidrolítico tem sido revolucionado nos últimos anos. Isto se deve à descoberta em microrganismos (especialmente fungos) das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs – *lytic polysaccharide monoxygenase*). Essas enzimas realizam clivagem oxidativa da celulose (e também de hemicelulose, amido e quitina) e, atualmente, a degradação desses polissacarídeos é considerada um processo hidrolítico e oxidativo. As LPMOs são capazes de clivar a celulose e outros polissacarídeos em suas regiões cristalinas usando um mecanismo oxidativo que depende da presença de íons metálicos divalentes (cobre) e de um doador de elétrons. LPMOs de diferentes famílias podem apresentar efeito sinérgico às hidrolases durante a hidrólise de substratos celulósicos e hemicelulósicos. Apesar desse potencial, somente um pequeno número de LPMOs tem sido caracterizado e validado como aditivo na conversão de biomassa. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar genes candidatos de LPMOs de fungos, bem como clonar e expressar esses genes em *P. pastoris*. A seleção de genes candidatos e a clonagem de seis genes de LPMOs de

<sup>1</sup> Biotecnologista, mestrando em biociências, Universidade Federal da Bahia, marcio.santana@colaborador.embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Universidade de Brasília kelly.rodrigues@colaborador.embrapa.br

<sup>3</sup> Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, fernanda.pinheiro@colaborador.embrapa.br

<sup>4</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

<sup>6</sup> Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

<sup>7</sup> Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

fungos em *P. pastoris* foram realizadas com sucesso, e a etapa de expressão foi confirmada até o momento para um desses genes.

## Introdução

A elevada demanda mundial de energia, as fontes de petróleo instáveis e incertas e a preocupação com a mudança climática global levaram ao interesse no desenvolvimento de tecnologias para geração de energias renováveis com o intuito de reduzir o consumo de combustível fóssil. Uma das alternativas é a utilização de biomassa vegetal para a produção de etanol de primeira ou segunda geração (celulósico) (HIMMEL, 2007).

As biomassas lignocelulósicas oriundas dos cultivos, colheitas e beneficiamento de grãos, cereais, gramíneas, etc. são recursos renováveis e possíveis substratos para obtenção de etanol de segunda geração. No entanto, o custo de obtenção desse biocombustível ainda é um dos obstáculos para exploração dessas biomassas vegetais. Todos os processos para o desenvolvimento dessa tecnologia ainda são trabalhados para melhorar os rendimentos de glicose durante a hidrólise e subsequente fermentação a etanol. A etapa de hidrólise enzimática da parede celular vegetal faz uso de combinações de enzimas microbianas a fim de vencer a recalcitrância da celulose e lignina (HIMMEL, 2007; WANG et al., 2014). Na hidrólise, a celulose e hemicelulose (dependendo do pré-tratamento) são degradadas por enzimas hidrolíticas microbianas em monossacarídeos e oligossacarídeos. Até recentemente, somente as enzimas hidrolíticas eram consideradas importantes na degradação de celulose e hemicelulose a açúcares fermentescíveis. A descoberta de que monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs de fungos principalmente, mas também de bactérias) aumentam a ação de enzimas hidrolíticas forneceu uma nova dimensão ao conceito clássico de degradação da celulose e da hemicelulose, conforme revisado por Horn et al. (2012) e Agger et al. (2014).

Genes codificadores de LPMOs são abundantes nos genomas de microrganismos capazes de converter biomassa e essas enzimas oxidativas representam um novo paradigma para degradação de polissacarídeos recalcitrantes, revelando sua importância para o desenvolvimento de biorrefinarias. Nesse aspecto, o estudo de novas LPMOs microbianas, sejam elas provenientes de bancos de dados, de espécies microbianas cultiváveis ou de

microrganismos não cultiváveis (abordagem metagenômica), pode permitir o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos mais eficientes para hidrólise de determinada biomassa de interesse. Paralelamente, sua utilização como aditivo durante a sacarificação de biomassa pode permitir uma diminuição na quantidade de enzimas hidrolíticas necessárias para sacarificação, reduzindo os custos de produção de etanol lignocelulósico, como apontam diversos estudos (KITTL et al., 2012; CANNELLA et al., 2016).

## Objetivo geral

Selecionar e clonar seis genes codificadores de LPMOs de fungos para expressão em levedura *P. pastoris*.

## Material e métodos

### Seleção e síntese de genes candidatos

A seleção dos genes de LPMOs de fungos filamentosos foi realizada utilizando programas e base de dados de domínio público, tais como CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes Database) e NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os critérios para seleção dos genes candidatos incluíram: revisão de literatura e de patentes, análise filogenética, taxonomia e biologia das espécies, capacidade de degradação de polissacarídeos. Dessa forma, cinco genes foram selecionados provenientes de espécies de fungos das classes Ascomycota e Basidiomycota (microrganismo 1 a 5). Também foi selecionado para síntese um gene de LPMO do ascomiceto *Trichoderma reesei*, já caracterizado na literatura, a fim de utilizá-lo como modelo e padrão de comparação nas etapas posteriores do trabalho. Para as análises de confirmação da expressão das proteínas (SDS-PAGE e Western blot), também foi incluída uma LPMO bacteriana modelo (de *Thermobifida fusca*) expressa em *P. pastoris* e purificada previamente (dados não mostrados).

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 (denominada  $\alpha$ -factor, nativa de *Saccharomyces cerevisiae*) existente no vetor de *P. pastoris*, pPICZ $\alpha$ A (Life Technologies). Após a remoção das sequências não alvo (peptídeo sinal nativo), foi necessário fazer análise desses genes modificados, de

forma a garantir a integridade do *frame* das construções para subclonagem no vetor de expressão (pPICZαA). 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 foi necessário adicionar dois nucleotídeos 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) e posteriormente foram sintetizadas e clonadas em vetor de expressão para *P. pastoris*.

### Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B foram preparadas para transformação por eletroporação, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001).

Os cinco genes sintetizados de LPMOs de fungos foram recebidos na forma liofilizada, contendo 5 µg de DNA. Esses foram então ressuspensos em 50 µL de tampão de eluição (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), para serem armazenados a uma concentração estoque de 100 ng/µL. As transformações de *E. coli* foram realizadas com 2 µL do DNA previamente diluído do estoque (10 ng/µL) e, em seguida, as células foram plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani Agar contendo zeocina (25 µg/µL) e crescidas a 37 °C, por 16 a 20 horas, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). De cada transformação, foram selecionadas três colônias das placas, que então foram inoculadas em 3 mL de meio Luria Bertani contendo zeocina (25 µg/µL). Para confirmar a inserção em pelo menos uma colônia, foi feita a extração do DNA plasmidial utilizando o kit '*QIAGEN Plasmid mini Kit*' e então realizada a clivagem do DNA plasmidial com *EcoRI* (extremidade 5´) e *XbaI* (extremidade 3´).

### Transformação de *P. pastoris* por eletroporação

Depois de confirmada a clonagem dos genes de LPMOs em *E. coli*, foi feita extração de DNA plasmidial utilizando kit '*QIAGEN Plasmid Midi Kit*' para obtenção da quantidade necessária de DNA (5 µg – 10 µg). Para a transformação de *P. pastoris* X-33, aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial foram clivados com

a enzima de restrição 'Sac I'. Essa linearização é necessária para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura. As transformações foram feitas de acordo com o protocolo 'EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen)' e então as leveduras foram inoculadas em YPDS (*Yeast Extract Peptone Dextrose+Sorbitol*) com zeocina (100 µg/µL) e incubadas a 30 °C por até 72 horas. As colônias que cresceram foram repicadas em placas para cultura de células com 96 poços (deep well) contendo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e zeocina (100 µg/µL) por até 48 horas e, posteriormente, criopreservadas (glicerol 30%).

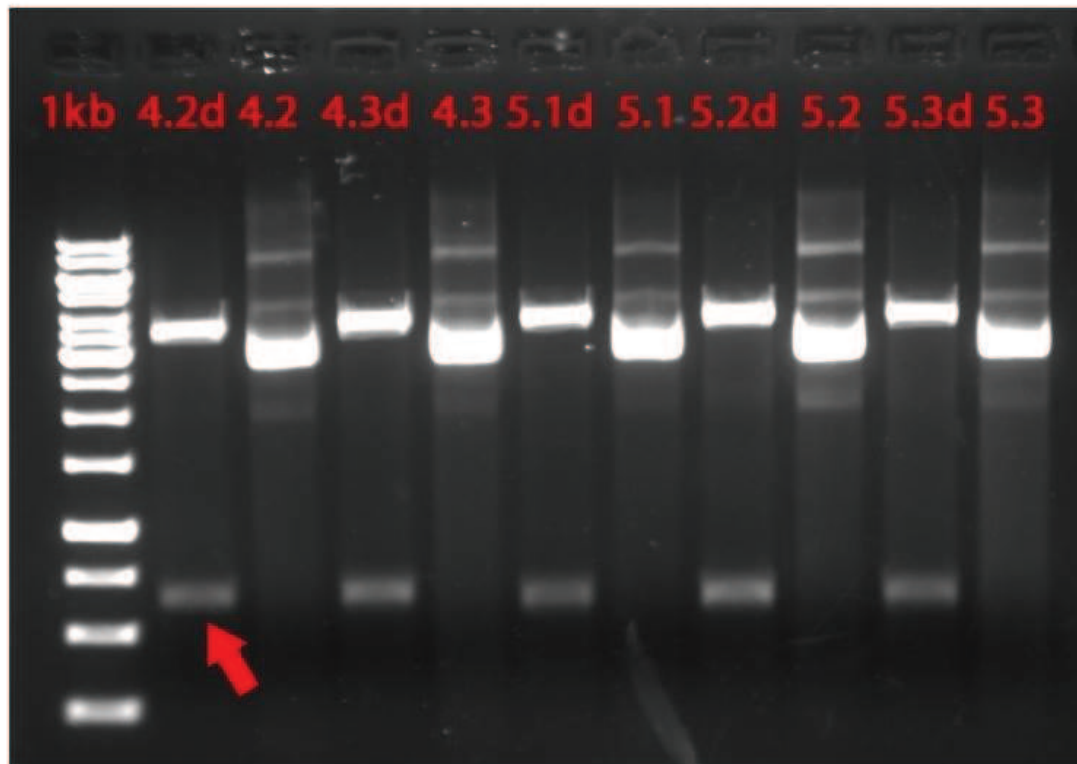
### Indução por metanol dos clones de *P. Pastoris* e análise molecular dos transformantes

Após a transformação da *P. pastoris*, o DNA genômico da levedura foi extraído com 'Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit'. Esse DNA genômico foi utilizado como molde na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com os primers 5' AOX1 e 3' AOX1 para confirmar a inserção do gene de interesse (genótipo ou padrão de bandas denominado Mut<sup>+</sup> *Methanol utilization plus*). Depois de confirmado o padrão de bandas do tipo Mut<sup>+</sup>, foi iniciada a indução com metanol para verificar se as proteínas codificadas pelos genes de LPMOs estavam sendo expressas. A indução para expressão das proteínas recombinantes foi realizada conforme descrito no manual 'EasySelect™ Pichia Expression Kit', com adaptações relacionadas à concentração de metanol. A confirmação da expressão das LPMOs foi feita por *immunoblotting* utilizando anticorpo anti His-tag e SDS-PAGE com corante Coomassie Blue R-250.

## Resultados e discussão

O padrão de bandas obtido na clivagem do DNA plasmideal com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI confirmou a clonagem dos genes de interesse em *E. coli*, conforme pode ser visto na Figura 1. A presença de dois fragmentos de DNA pode ser observada nas amostras digeridas, como o exemplo indicado pela seta (4.2d).

Os vetores não digeridos com enzima de restrição apresentaram tamanho de 3.600 pb (4.2), enquanto os digeridos apresentaram duas bandas (de 3.000 pb e 600 pb, aproximadamente), que correspondem aos tamanhos esperados do vetor e do gene inserido, respectivamente.



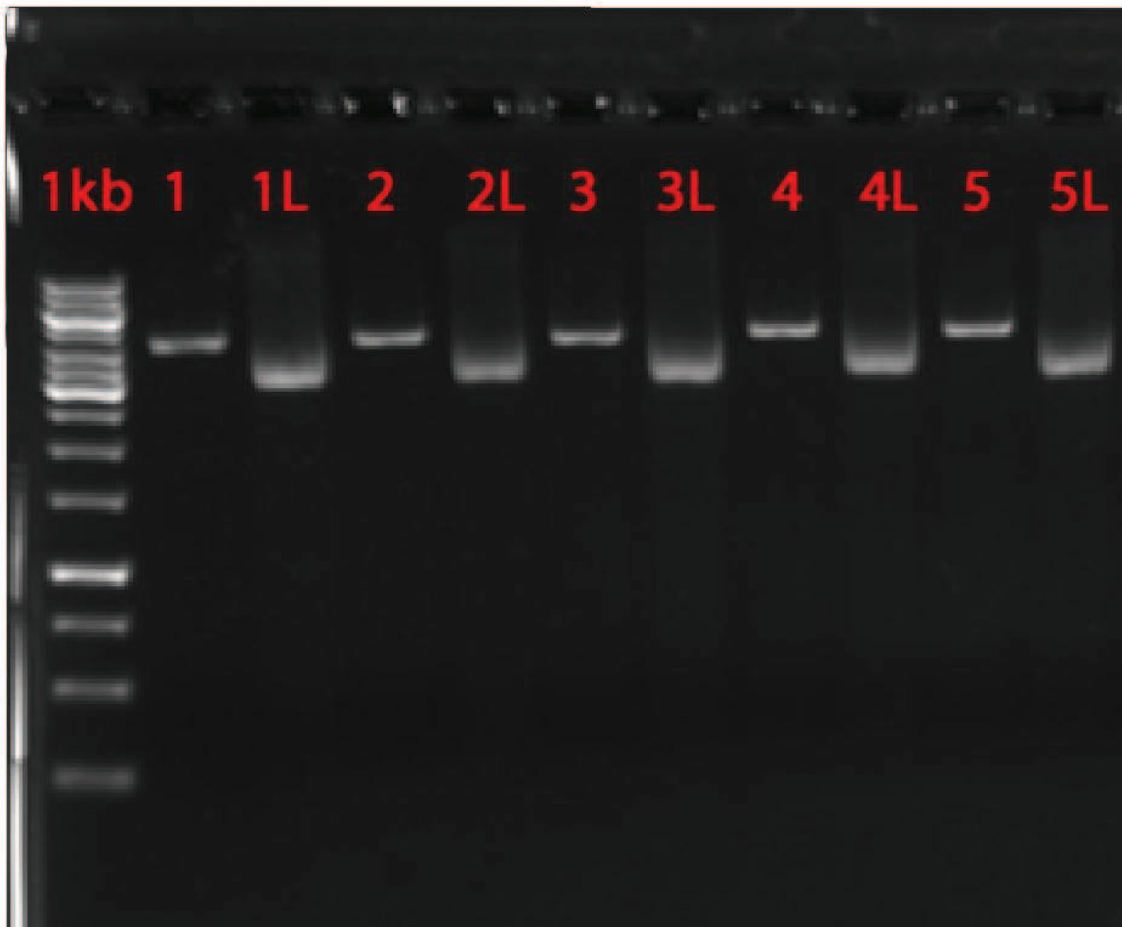
**Figura 1.** Clivagem enzimática com EcoRI e XbaI. Clivagem do DNA plasmidial de *E.coli* transformada por eletroporação mostrando os padrões de bandas do plasmídeo digerido e não digerido (4.2, 4.3 – Basidiomycota; 5.1, 5.2, 5.2 – Ascomycota), em que a letra ‘d’ representa o plasmídeo digerido e a seta indica o tamanho do fragmento esperado do gene inserido. 1kb - GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 2 é apresentado o resultado da linearização com *SacI* do DNA plasmidial extraído de *E. coli* contendo os genes dos fungos provenientes de Basidiomycota (1, 3 e 4) e Ascomycota (2 e 5) que foram selecionadas ao crescerem em meio de cultura Luria Bertani Agar com zeocina.

Após a transformação de *P. pastoris* com o DNA linearizado, iniciou-se, então, a busca por transformantes com padrão de bandas do tipo Mut<sup>+</sup> (*Methanol utilization plus*). O padrão de bandas Mut<sup>+</sup> é indicado pela amplificação de duas bandas (tendo o DNA genômico de *P. pastoris* como molde), uma correspondente ao tamanho do gene de interesse (~588 pb) e a outra correspondente ao gene AOX1 da levedura (aproximadamente 2,2 Kb). Durante a transformação, caso a recombinação ocorra na região 3’AOX1, o gene selvagem AOX1 da *P. pastoris* irá sofrer disrupção, tendo então a capacidade de utilizar o metanol como fonte de carbono reduzida, sendo chamada de transformante Mut<sup>s</sup> (*methanol utilization*

*slow*). Entretanto, a expressão da proteína heteróloga ainda pode ocorrer em menor quantidade.



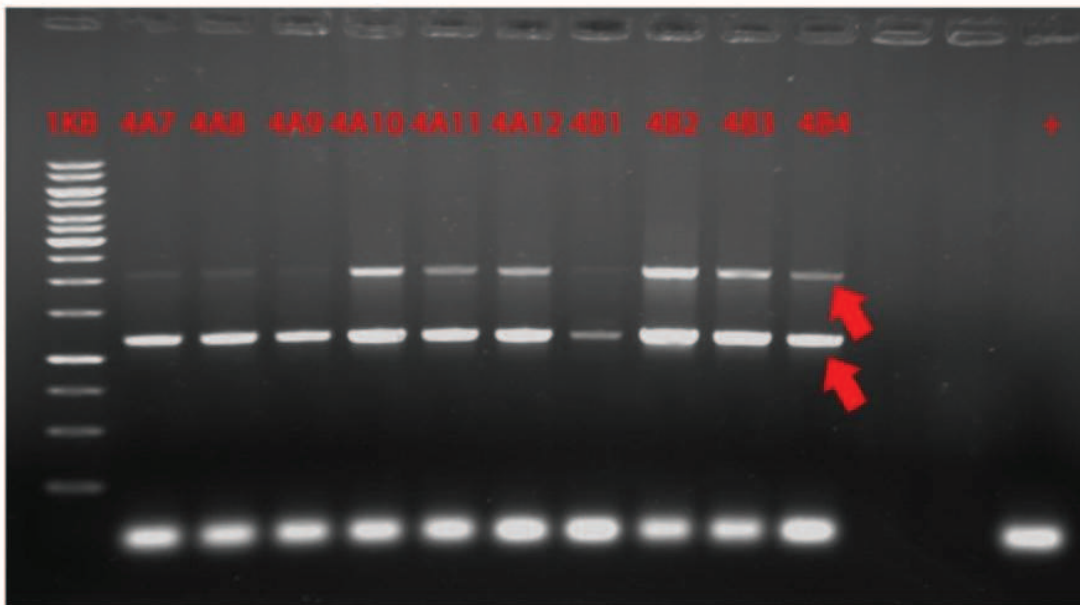
**Figura 2.** Linearização do DNA plasmidial de *E. coli* com *SacI* dos clones de Basidiomycota (1, 3 e 4) e Ascomycota (2 e 5). Resultado da linearização do DNA plasmidial de *E. coli* em que 1 é o plasmídeo não linearizado e 1L é o plasmídeo linearizado seguindo o mesmo código para os demais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 3, podemos observar o padrão de bandas  $Mut^+$  que foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico extraído de diferentes clones de *P. pastoris* (indicado pelas setas vermelhas). Nessa figura podemos observar que alguns transformantes de *P. pastoris* possuem o padrão de bandas  $Mut^+$  desejado, por exemplo, o transformante B4 com o gene do microrganismo 4 (4B4 - Basidiomycota). Assim, todos transformantes que possuem o padrão de bandas  $Mut^+$  foram selecionados para a etapa de indução.

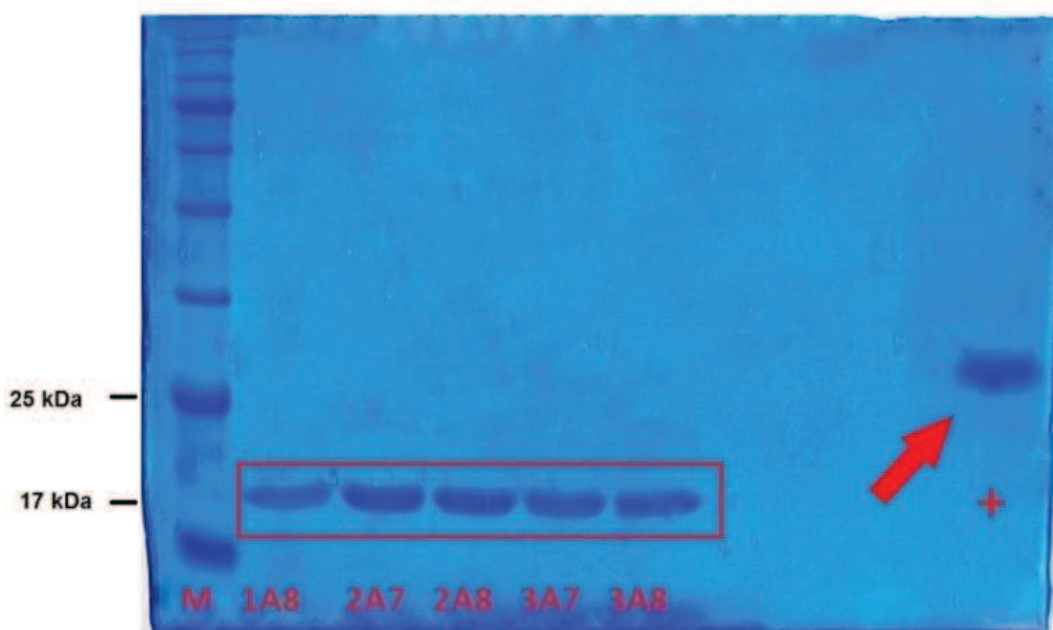
Nas Figuras 4 e 5, podem ser observados os resultados da análise de SDS-PAGE e de Western Blot, respectivamente, de 5 LPMOs selecionadas neste trabalho. Apenas o tempo de 72 horas de indução foi submetido à análise. Em ambas as

Figuras, podem ser observadas bandas da proteína utilizada como controle positivo (LPMO da bactéria *Thermobifida fusca* fusionada à cauda de histidina).



**Figura 3.** PCR do DNA genômico de *P. pastoris* com primers 5'AOX1 e 3'AOX1. Avaliação da integração por PCR do gene de Basidiomycota (4) no genoma de dez clones de *P. pastoris*. 1kb - Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

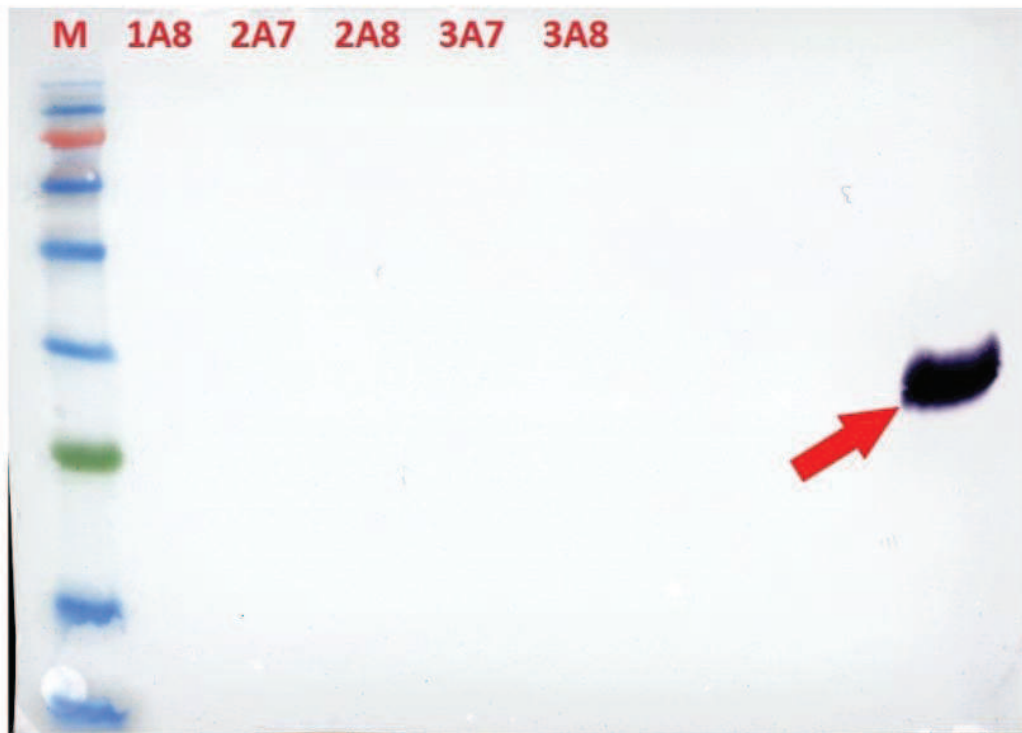
Fonte: Arquivo pessoal.



**Figura 4.** SDS-PAGE da indução de *P. pastoris* recombinante – 72 h. SDS-PAGE da indução realizada com cinco clones de *P. Pastoris* transformadas com genes de Basidiomycota (1 e 3) e Ascomycota (2). Controle positivo (LPMO da bactéria *Thermobifida fusca*).

Fonte: Arquivo pessoal.





**Figura 5.** Western Blot da indução de *P. pastoris* recombinante – 72 h. Western Blot da indução realizada com cinco clones de *P. Pastoris* transformadas com genes de Basidiomycota (1 e 3) e Ascomycota (2). Controle positivo (LPMO da bactéria *Thermobifida fusca*).

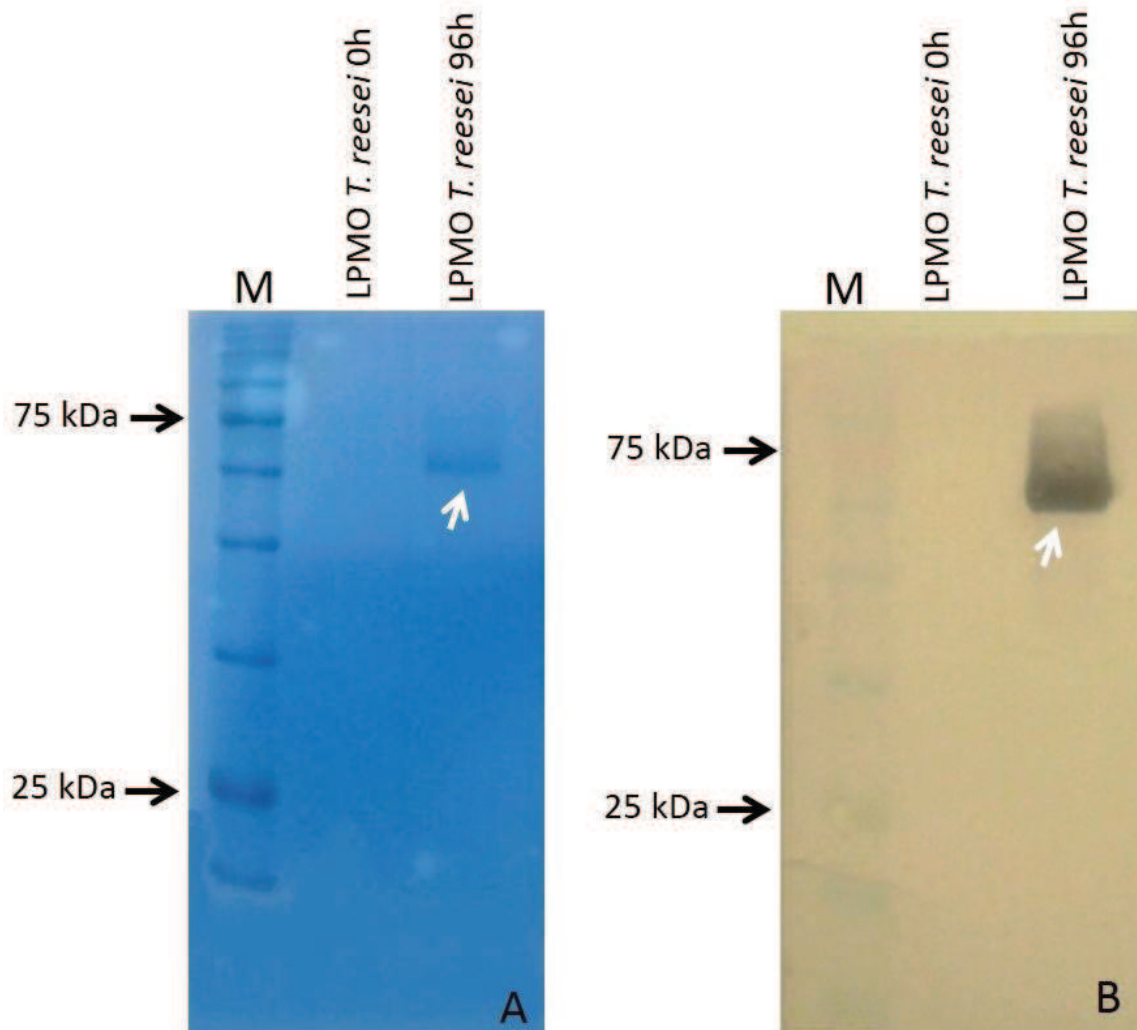
Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 4, ainda é possível observar a secreção de proteínas (retângulo vermelho) durante o processo de indução, mostrando que ocorreu o crescimento da levedura. No entanto, não foi possível visualizar a cauda de histidina das LPMOs de origem fúngica clonadas em *P. pastoris* após a indução por metanol, como observado na Figura 5.

As proteínas secretadas na Figura 4 indicam que há secreção de proteínas heterólogas (LPMOs), uma vez que a expressão de proteínas heterólogas normalmente ocorre em maior quantidade do que as proteínas nativas (não visualizadas no gel), porém o tamanho delas, cerca de 17 kDa, não confere com o tamanho esperado das LPMOs de fungos, 25 kDa a 30 kDa. Assim, é possível que na LPMO exista um ponto de clivagem sendo identificado por proteases durante a tradução na porção C-terminal, onde está a cauda de histidina.

Dessa forma, pode-se dizer que a técnica foi realizada corretamente, porém a expressão das LPMOs selecionadas não foi detectada, ou porque não foram expressas, ou, se expressas, não foram secretadas. Wang (2014) já demonstrou que

pode ocorrer degradação de proteínas heterólogas por proteases, o que afeta consideravelmente a detecção no Western Blot.



**Figura 6.** SDS-PAGE e Western Blot de *P. pastoris* 0 h e 96 h. Resultado da indução de *P. pastoris* com o gene modelo de LPMO proveniente de *T. reesei*.

Ilustração: Kelly Barreto Rodrigues.

Na Figura 6, observamos a LPMO modelo do fungo *T. reesei* expressa em *P. pastoris*, em que podemos observar uma proteína com cerca de 75 kDa e é possível observar que a cauda de histidina na LPMO modelo está presente.

## Considerações finais e perspectivas

Até o momento, foi possível confirmar a expressão de uma LPMO modelo previamente caracterizada do fungo *T. reesei*, utilizando o sistema de expressão de *P. pastoris*.

Embora a análise molecular de transformantes de *P. pastoris* contendo novos genes de LPMOs selecionados de ascomicetos e basidiomicetos tenha confirmado o padrão de bandas esperado, até o momento não foi possível confirmar se as proteínas heterólogas estão sendo expressas.

Novas tentativas serão realizadas com algumas alterações nos protocolos utilizados a fim de conseguir expressar as LPMOs recombinantes selecionadas. Uma vez expressas, deverão ser feitos testes para determinação da atividade enzimática, utilizando diferentes metodologias, tais como análise por espectrometria de massas e ensaios colorimétricos de oxidação/redução.

## Apoio financeiro

Este trabalho foi realizado com recursos financeiros do projeto Upzyme (Embrapa), da Embrapa Agroenergia e também do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES).

## Referências

AGGER, J. W.; ISAKSEN, T.; VARNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G. T.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; WESTERENG, B. EIJSINK AND B. WESTERENG. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, DC, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014.

BENNATI-GRANIER, C.; GARAJOVA, S.; CHAMPION, C.; GRISEL, S.; HAON, M.; ZHOU, S.; FANUEL, M.; ROPARTZ, D.; ROGNIAUX, H.; GIMBERT, I.; RECORD, E.; BERRIN, J. G. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, número do artigo 90, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136828>>. Acesso em: ago. 2016.

CANNELLA, D.; MÖLLERS, K. B.; FRIGAARD, N.-U.; JENSEN, P. E.; BJERRUM, M. J.; JOHANSEN, K.; FELBY, C. Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. **Nature Communications**, London, v. 7, artigo número 11134, 2016.

HIMMEL, M. E. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, Washington, DC, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, número do artigo 45, 2012.

KITTL, R.; KRACHER, D.; BURGSTALLER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monoxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for biofuels**, London, v. 5, artigo número 79, 2012.

MURALEEDHARAN, M. N.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; SANDGREN, M. Enhanced release of oxidized sugars by Lytic Polysaccharide MonoOxygenases, by the effect of synergistic action with endoglucanases. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 38., 2016, Baltimore, MD. [Anais...]. [S.l: s.n], 2016.

SAMBROOK, J. R.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: CHS Press, 2001.

WANG, W.; LIU, C.; MA, Y.; LIU, X.; ZHANG, K.; ZHANG, M. 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.