

Clonagem e expressão do gene de celobiohidrolase (cbh1.2) do fungo *Humicola grisea* var. *Thermoidea* em *Pichia pastoris*

OLIVEIRA, Gisele Silva¹; POÇAS-FONSECA, Márcio José²; SILVA-PEREIRA, Ildinete³; FARIA, Fabrícia Paula².

¹ Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, ICBII, UFG, Goiânia, GO.

² Depto. de Genética e Morfologia, IB, UnB, Brasília, DF.

³ Depto. de Biologia Celular, IB, UnB, Brasília, DF.

Palavras-chave: *Humicola grisea* var. *thermoidea*, celobiohidrolase, *Pichia pastoris*, expressão heteróloga

1. INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal pode ser uma fonte de energia e materiais úteis para a humanidade, sendo a celulose o biopolímero mais abundante (Lynd *et al.*, 2002). Uma das etapas necessárias para a fermentação da celulose em combustíveis ou produtos de interesse biotecnológico é a sua hidrólise. Vários microrganismos são capazes de hidrolisar a celulose em unidades de glicose, pois produzem um conjunto de enzimas conhecido como sistema celulolítico. O sistema celulolítico é composto de: (i) endoglucanases (EG) que clivam as cadeias de celulose em sítios internos, (ii) celobiohidrolases ou exoglucanases (CBH) que atuam nas extremidades das cadeias de celulose liberando glicose ou celobiose e (iii) beta-glicosidases (BGL) que produzem monômeros de glicose a partir de celobiose (GILKES *et al.*, 1991). As enzimas do sistema celulolítico (celulases) podem ser empregadas na indústria de alimentos, cerveja, vinho, ração animal, têxtil, papel e celulose e na sacarificação da biomassa dos resíduos agroindustriais (Bhat, 2000). Esses resíduos representam uma fonte renovável de energia, que deve ser melhor aproveitada, principalmente pelo Brasil, por ser um país que tem na agricultura e extração nativa uma grande fonte de capital (Reyes *et al.*, 1998).

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* apresenta um eficiente sistema celulolítico composto de EGs, CBHs e BGL termoestáveis. Recentemente foram clonados e caracterizados dois genes de CBHs do fungo *H. grisea*: *cbh1.1* (Azevedo *et al.*, 1990) e *cbh1.2* (Poças-Fonseca *et al.*, 1997). O gene *cbh1.2* codifica uma proteína de 451 aminoácidos com massa molecular de 49.6 kDa, pI de 5.27 e que representa a principal proteína secretada pelo fungo sob o cultivo em substratos lignocelulósicos (de Paula *et al.*, 2003). A proteína CBH1.2 predita apresenta alta similaridade com CBHs fúngicas da família 7 das glicosil hidrolases (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). As CBHs apresentam dois domínios: o domínio catalítico e o domínio de ligação a celulose (CBD) ligados por uma seqüência rica em serina e prolina (Gilkes *et al.*, 1991), já a enzima CBH1.2 não possui um CBD, diferentemente das demais celulases.

Os genes que codificam as celulases de diferentes microrganismos têm sido clonados e expressos em vários organismos hospedeiros (fungos e bactérias), com vistas à produção, caracterização e aplicação de celulases recombinantes com em diferentes processos biotecnológicos. Os genes que codificam as celobiohidrolases

têm sido expressos em leveduras como: *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

A levedura metilotrófica *P. pastoris* apresenta vantagens como: processo fermentativo bem estabelecido e economicamente viável, metodologia de manipulação genética bem estabelecida, expressão de proteínas heterólogas sob o controle de promotores fortes e induzíveis (Cregg *et al.*, 1993) e produção de proteínas heterólogas em grande quantidade. Outra característica importante da levedura *P. pastoris* é o seu perfil de glicosilação que é compatível com o de proteínas eucarióticas. Nas leveduras metilotróficas, o metanol é inicialmente oxidado nos peroxissomas pela ação das enzimas álcool oxidase, catalase e dihidroxiacetona sintase. Durante o crescimento de *P. pastoris* em metanol, a enzima álcool oxidase (AO) constitui a proteína mais abundante da célula chegando a representar 30% das proteínas celulares totais (Couderc & Baratti, 1980). A expressão da AO é induzida na presença de metanol e reprimida na presença de glicose ou glicerol. A enzima AO é codificada pelos genes AOX1 e AOX2, o promotor de AOX1 tem sido utilizado no vetor de expressão em *P. pastoris*, pHILD2.

O presente trabalho tem como objetivo realizar a expressão heteróloga do gene *cbh1.2* de *Humicola grisea* na levedura *P. pastoris* para a posterior caracterização enzimática e estudo da aplicação da enzima em processos biotecnológicos. Para a expressão em *P. pastoris*, o cDNA do gene *cbh1.2* será clonado no vetor pHILD2 e expresso sob o controle do promotor do gene da álcool oxidase (AOX1).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e Vetores

Os experimentos serão conduzidos com a linhagem de *P. pastoris* (GS115) e o vetor de expressão pHILD2 (Invitrogen).

2.2. Amplificação do cDNA de *cbh1.2* por PCR

O cDNA de *cbh1.2* clonado no vetor PGEM-T-Easy (PCD9.5) (Poças-Fonseca *et al.*, 2002) foi amplificado por PCR utilizando os “primers” de expressão 1.2CDF3 e 1.2CDR3 e clonado no vetor pGEM-T (pGEM-*cbh1.2*).

2.3. Clonagem do cDNA de *cbh1.2* no vetor de expressão

O cDNA de *cbh1.2* foi obtido após digestão do vetor pGEM-*cbh1.2* com a enzima *EcoRI* e posteriormente clonado no vetor pHILD2/*EcoRI* (pHILD2-*cbh1.2*). A orientação da clonagem do cDNA de *cbh1.2* no vetor pHILD-2 foi confirmada após a análise do perfil de restrição de pHILD2-*cbh1.2* e sequenciamento.

2.4. Transformação de células de *P. pastoris*

A transformação das células de *P. pastoris* foi realizada por eletroporação segundo instruções do fabricante (Invitrogen).

2.5. Análise dos Transformantes produtores da enzima CBH1.2

Os transformantes serão cultivados em meio seletivo MD (YNB – sem aminoácidos - 1,34%, dextrose 1%, biotina 4×10^{-5}) por três repiques e posteriormente analisados quanto a capacidade de produzir e secretar a enzima ativa utilizando a metodologia de atividade em placa: as leveduras serão incubadas

em meio sólido BMG (YNB 1,34%, glicerol 1%, fosfato de potássio 100mM, biotina 4×10^{-5}) por quatro dias a 30°C, transferidas para o meio BMM sólido (YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} , fosfato de potássio 100mM, 1% metanol) e incubadas por cinco dias a 30°C. A placa contendo as culturas será sobreposta com uma camada de solução de celulose/agarose e incubada por três horas a 50°C. A revelação será conduzida com solução de “Congo-Red” 1% durante 10 minutos e lavada em seguida com solução de NaCl (1M). A atividade enzimática será visualizada como um halo de hidrólise ao redor da cultura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Amplificação do cDNA/cbh1.2 por PCR e

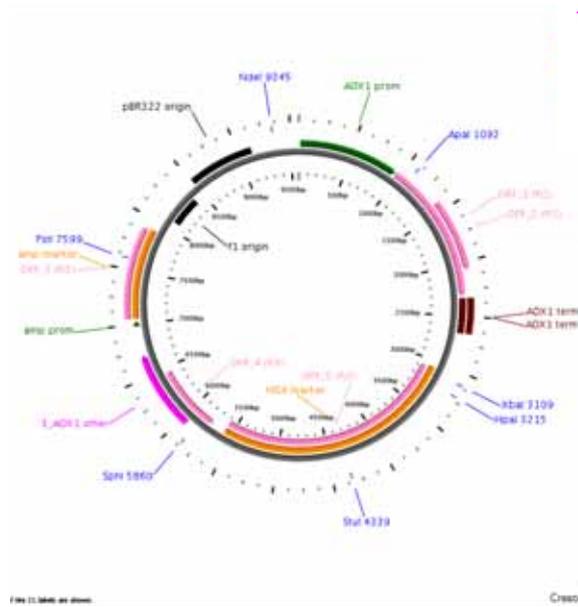
O cDNA/cbh1.2 foi amplificado por PCR com os “primers” de expressão como um produto de PCR de 1,4 kb. O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T resultando no vetor pGEMT-cbh1.2.

3.2. Clonagem do cDNA/cbh1.2 no vetor pHILD-2

O vetor pGEMT-cbh1.2 foi digerido com a enzima *EcoR*-I, o inserto foi eluído do gel e clonado no vetor de expressão pHIL-D2 (Figura 1). A inserção do cDNA/cbh1.2 no vetor pHILD2-cbh1.2 foi confirmada através de PCR de colônia com os “primers” de expressão e com a digestão do vetor pHILD2-cbh1.2 com a enzima de restrição *EcoR*1, que leva a liberação de uma banda de 1,4 kB, que representa o cDNA/cbh1.2 (Figura 2A). A orientação de inserção do cDNA/cbh1.2 no vetor pHILD-2 foi confirmada com a análise do perfil de restrição do vetor pHILD2/cbh1.2 com as enzimas de restrição *Sac*I e *Hind*III. A digestão com a enzima *Sac*I gerou dois fragmentos: 1,7 Kb e 7,7 Kb, conforme o esperado quando se tem o inserto inserido de forma correta no vetor de expressão (Figura 2A). A digestão do vetor pHILD2/cbh1.2 com a enzima *Hind* III obteve-se os seguintes fragmentos: 1,78 Kb e 8,5 Kb (Figura 2B). Dos clones analisados o clone 4 foi escolhido desde que apresentou a orientação correta do cDNA/cbh1.2.

3.3. Transformação de células de *P. pastoris*

Para a transformação de células de *P. pastoris* GS115 com o vetor de expressão pHILD2/cbh1.2. O DNA plasmidial do clone 4 foi digerido com a enzima de restrição *Not* I, que cliva o vetor antes do promotor de AOX1 e após a região terminadora de AOX1, liberando o cassete de expressão pHILD2/cbh1.2/*Not*I. Posteriormente o cassete de expressão e o vetor pHILD2/cbh1.2 intacto foram introduzidos em células de *P. pastoris* por eletroporação. Os transformantes foram selecionados após cultivo em meio seletivo.



ORF 1 e 2: "open reading frame" do cDNA/cbh1.2

Figura 1 – Vetor de expressão pHIL-D2/cbh1.2. ORF 1 e 2 (rosa): cDNA/cbh1.2. AOX1 prom, term e other: região promotora, terminadora e região 3' do gene AOX1. HIS4 marker: gene da marca de seleção HIS4. Amp prom: gene Amp^r.

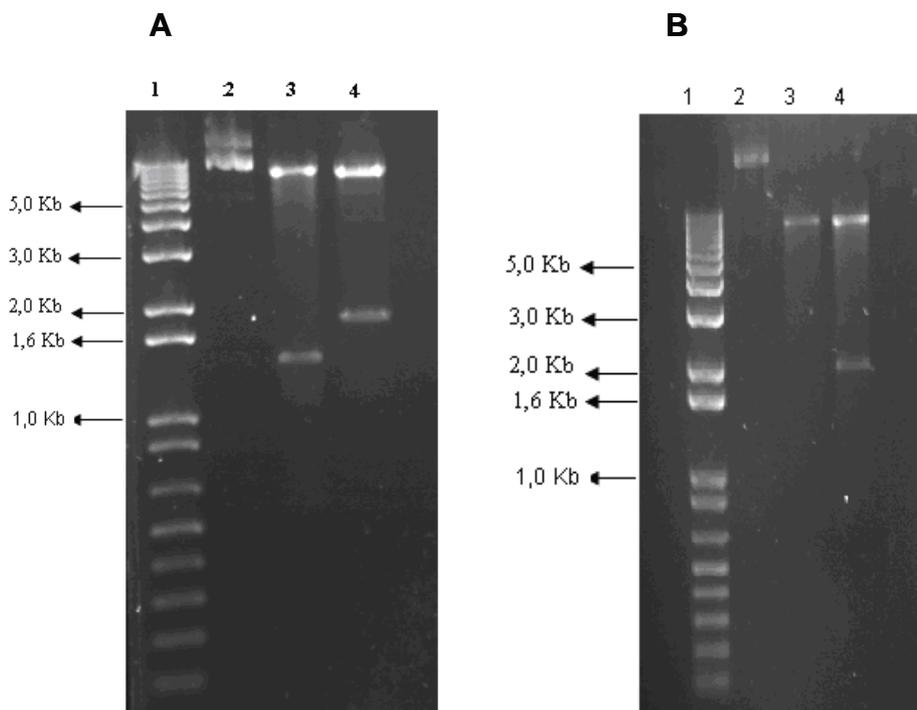


Figura 2 – Fragmentos de DNA em gel de agarose. Perfil de restrição do vetor pHILD2/cbh1.2 para a análise da orientação de clonagem do cDNA/cbh1.2 no vetor pHILD2. **A.** Clone 4 digerido com as enzimas *EcoR*-I e *Sac*I: 1 - marcador 1kb ladder, 2- clone 4 intacto, 3- clone 4 digerido com *EcoR*1, 4 – clone 4 digerido com *Sac*I. **B.** Clone 4 digerido com a enzima *Hind*III 1 – marcador 1kb ladder, 2 clone 4 intacto, 3 pHIL-D2 digerido com *Hind*III, clone 4 digerido com *Hind*III.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; ASTOLFI, S. F. & RADFORD, A. Cloning, sequencing and homologies of the *cbh-1* (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. J. Gen. Microbiol., v. 136, p. 2569-2576, 1990.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Advances, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BAYER, E. A & LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? Biodegradation, v. 3, p. 171-88, 1992.
- BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol., v. 44, p. 219-248, 1990.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S. & RASCHKE, W. C. Recent Advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology, v. 11, p. 905-910, 1993.
- de PAULA, E. H.; POÇAS-FONSECA, M. J. & AZEVEDO, M. O. The product of *Humicola grisea* var. *Thermoidea cbh1.2* gene is the major protein under induction by lignocellulosic residues. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 19, p. 631-635, 2003.
- GILKES, N. R.; HENRISSAT, B.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. & WARREN, R. A. J. Domains in microbial β -1-4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. Microbiological Reviews, v. 55 (2), p. 303-315, 1991.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. Journal of Bacteriology, v.153 (1), p.163-168, 1983.
- LYND, L. R., Weimer, P.J.; van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. Microbial Cellulose Utilization: fundamentals and biotechnology. Microb. Mol. Biol. Reviews, v. 66 (3), p. 506-577, 2002.
- POÇAS-FONSECA, M.J., SILVA-PEREIRA, I., ROCHA, B.B. & AZEVEDO, M.O. Substrate-dependente differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. Canadian Journal of Microbiology, v. 46, p. 749-752, 1997.
- POÇAS-FONSECA, M.J.; PEREIRA, I.S.; FELIPE, M.S.; ROCHA, B.B. & AZEVEDO, M.O. Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. Can.Microbiol., v. 46, p. 749-752, 2000.

FONTE DE FINANCIAMENTO – FINEP e CNPq