



UNIVERSIDADE
DO BRASIL

UF RJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



Fundação

CECIERJ

Consórcio cederj

CLONAGEM DA CELOBIOSE DESIDROGENASE 1 DE *NEUROSPORA*
CRASSA NA LEVEDURA *PICHIA PASTORIS*

LUCAS JORGE MARIANNO COSTA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2019



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UF RJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



CLONAGEM DA CELOBIOSE DESIDROGENASE 1 DE *NEUROSPORA*
CRASSA NA LEVEDURA *PICHIA PASTORIS*

LUCAS JORGE MARIANNO COSTA

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.
Orientador (a): Dr. Marcelo Neves de Medeiros

ORIENTADOR: Marcelo Neves de Medeiros

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
POLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Lucas Jorge Marianno

Clonagem da celobiose desidrogenase 1 de *Neurospora crassa* na levedura *Pichia pastoris*. Duque de Caxias, 2019. 45 f. il: 31 cm

Marcelo Neves de Medeiros

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EaD. 2019.

Referências bibliográficas: f. 40-45

1. Bioquímica, Celobiose desidrogenase, *P.pastoris*, biossensor, glicosilação

I. MEDEIROS, Marcelo Neves de

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EaD

III. Clonagem da celobiose desidrogenase 1 de *Neurospora crassa* na levedura *Pichia pastoris*.

Agradecimentos

Aos meus pais, que sempre colocaram a minha educação em primeiro lugar. Além do apoio financeiro durante esses anos.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Medeiros, por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto, pela dedicação, paciência e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste período;

À professora Eleonora Kurtenbach que cedeu gentilmente o plasmídeo e a levedura utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos do LAMAC, Luanda e Jonatha, que estavam sempre dispostos a ajudar.

As grandes amigas Marianne e Veronica que me acompanham e apoiam desde a graduação.

As novas amigas que surgiram durante os trabalhos: Chayenne, Dani, Luths, Priscila, Raquel Correa.

E finalmente, agradeço ao INMETRO, CNPq e PRONAMETRO pela bolsa de estudo e o apoio financeiro ao projeto.

Resumo

A celobiose desidrogenase (CDH) é uma oxidoreductase extracelular produzida por fungos lignocelulolíticos e com dois domínios distintos. Um grande domínio catalítico desidrogenase (DH) contendo FAD como cofator e um pequeno domínio citocromo (CYT) contendo o cofator heme-b, conectados por uma sequência *linker*. Em virtude das suas propriedades catalíticas tanto em solução quanto imobilizadas em superfícies condutoras, as CDHs têm um grande potencial para o desenvolvimento de biossensores e células de biocombustíveis por causa das suas habilidades de transferência direta de elétrons (DET) quando imobilizada, além do emprego em biorremediação de compostos aromáticos e deslignificação de biomassa celulósica através da ação redutora quando em solução. A expressão heteróloga da CDH utilizando a levedura *Pichia pastoris* é uma alternativa para a produção em larga escala. No entanto a alta taxa de glicosilação deste hospedeiro pode impactar nas propriedades cinéticas da CDH, inclusive na DET. Portanto, o objetivo do trabalho foi produzir heterologamente a CDH recombinante selvagem, para avaliar futuramente o seu desempenho. Para isto, o fragmento sintético de DNA que compõe a sequência da CDH de *Neurospora crassa* (NcCDH) foi adquirido comercialmente. As construções NcCDH wt (selvagem) e o vetor pPICZαC foram então clonadas em vetor de expressão induzida por metanol e transformadas em *P. pastoris*. Os resultados sugerem a transformação bem sucedida da *Pichia pastoris* X-33 com o vetor de expressão modulável por metanol contendo o gene da CDH1. O trabalho de expressão heteróloga está em andamento com uma estratégia para aprimorar o processo de fermentação e de purificação, desta forma, irá melhorar bastante o rendimento geral na obtenção das proteínas recombinantes de interesse no futuro.

Palavras-chave: Bioquímica, Celobiose desidrogenase, *P.pastoris*, biossensor, glicosilação.

Abstract

Cellobiose dehydrogenase (CDH) is an extracellular oxidoreductase produced by lignocellulolytic fungi and with two distinct domains. A large catalytic dehydrogenase (DH) domain containing FAD as a cofactor and a small cytochrome domain (CYT) containing the b-type heme cofactor, connected by a linker sequence. Due to their catalytic properties both in solution and immobilized on conductive surfaces, CDHs have great potential for the development of biosensors and biofuel cells because of their direct electron transfer (DET) performance when immobilized, as well as their use in bioremediation of aromatic compounds and delignification of cellulosic biomass through the reducing action when in solution. The heterologous expression of CDH using yeast *Pichia pastoris* is an alternative strategy for large scale production. However, the high glycosylation rate of this host may have an impact on the kinetic properties of CDH, including DET performance. Therefore, the aim of this work was to produce heterologous wild-type recombinant CDH to further evaluate the performance. To this end, the synthetic DNA fragments that make up the *Neurospora crassa* CDH (NcCDH) sequence were obtained commercially. The NcCDH wt (wildtype) constructs and the pPICZ α C vector were then cloned into methanol-induced expression vector and transformed into *P. pastoris*. The results suggest the successful transformation of *Pichia pastoris* X-33 with the methanol-modulating expression vector containing the CDH1 gene. The heterologous expression work is underway with a strategy of enhancing the fermentation and purification process will greatly enhance the overall yield in obtaining the recombinant proteins of interest in the future.

Keywords: Biochemistry, Cellobiose dehydrogenase, *P.pastoris*, biosensor, glycosylation.

Lista de ilustrações

Figura 1: Vias de transferência de elétrons do substrato pelo domínio DH para diversos receptores de elétrons (adaptado LUDWIG et al., 2013).	15
Figura 2: Estrutura da celobiose desidrogenase do fungo <i>Myriococcum thermophilum</i>	16
Figura 3: Esquema geral de um biossensor (adaptado de MARTINS <i>et al.</i> , 2013).	18
Figura 4: Mecanismos de resposta de diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos.	19
Figura 5: Esquema simplificado de uma placa de petri dividida em quadrantes.	30
Figura 6: Vetor de clonagem.....	32
Figura 7: Gel de agarose 1% com amostra das PCRs.	33
Figura 8: Monitoramento dos plasmídeos.	34
Figura 9: Mapa do vetor de expressão contendo a sequência-alvo e os <i>primers</i> utilizados para o sequenciamento.	35
Figura 10: Ensaio de resistência a zeocina.....	36
Figura 11: Cinética de redução do DCPIP.	37

Lista de tabelas

Tabela 1: Classe das enzimas e os tipos de reações correspondentes (modificado SINGH <i>et al.</i> , 2016).....	13
Tabela 2: Composição dos meios de cultura empregados.....	23
Tabela 3: Lista dos <i>primers</i> utilizados e suas sequências.	24
Tabela 4: Componentes da PCR para amplificar o fragmento.	24
Tabela 5: Componentes da PCR para amplificar o plasmídeo.....	25
Tabela 6: Componentes da reação <i>In-fusion</i>	26
Tabela 7: Componentes da PCR para verificar a integração dos fragmentos ao vetor	27

Lista de abreviaturas e siglas

AE – aceptores de elétrons

AO – Álcool oxidase

BSA – Albumina de soro bovino

CDH – Celobiose desidrogenase

CYT – subunidade citocromo

DCPIP – 2,6-diclorofenol indofenol

DET – *Direct electron transfer* (Transferência direta de elétrons)

DH – Desidrogenase

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EC – *Enzyme commission*

E. coli – *Escherichia coli*

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

g – Gravidade

HPLC – *High performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IET – *Intramolecular electron transfer* (transferência intramolecular de elétrons)

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology

IUPAC – *Union for Pure and Applied Chemistry*

kDa – kilodalton

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NcCDH – Celobiose desidrogenase de *Neurospora crassa*

nt - Nucleotídeo

pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDB – Protein data bank

Rpm – Rotação por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SOC – Super optimal broth with catabolite

TEV – Tobacco etch virus

Tm – Temperatura de melting

Wt – Wildtype

YPD – Yeast peptone dextrose

YPDS – Yeast peptone dextrose sorbitol

YPG – Yeast peptone glycerol

YPM – Yeast peptone methanol

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	12
1.1 – TECNOLOGIA ENZIMÁTICA.....	12
1.2 – OXIDORREDUTASES	13
1.3 – CELOBIOSE DESIDROGENASE.....	14
1.3.1 – Características físicas	14
1.3.2 – Função biológica	16
1.4 – APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DAS CDH	17
1.4.1 – Biossensores	17
1.5 – EXPRESSÃO EM PICHIA PASTORIS	19
2 – JUSTIFICATIVA	21
3 – OBJETIVO GERAL	22
3.1 – OBJETIVO ESPECÍFICO.....	22
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 – MATERIAIS E REAGENTES	22
4.2 – OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DE NCCDH WT.....	22
4.3 – MEIOS DE CULTURA.....	23
4.4 – PRIMERS.....	23
4.5 – OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DA CDH SELVAGEM RECOMBINANTE POR PCR.....	24
4.6 – AMPLIFICAÇÃO DO VETOR	25
4.7 – OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO SEQUÊNCIA CODIFICANTE COMPLETA DA CDH RECOMBINANTE POR LIGAÇÃO INDEPENDENTE DE CLONAGEM	26
4.8 – TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DOS CLONES DE E. COLI.....	27
4.9 – MIDIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	28
4.10 – SEQUENCIAMENTO.....	28
4.11 – DIGESTÃO DO DNA COM SACI	29
4.12 – PREPARO DAS PICHIA PASTORIS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO.....	29
4.13 – SELEÇÃO DOS CLONES (SCREENING DOS TRANSFORMANTES).....	29
4.14 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO	30
4.15 – ENSAIO ENZIMÁTICO.....	30
5 – RESULTADOS	31
5.1 – CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE	31
5.2 – CLONAGEM DA CDH E TRANSFORMAÇÃO EM PICHIA PASTORIS.....	32
5.3 – EXPRESSÃO DAS CDHS E ATIVIDADE.....	36
6 – DISCUSSÃO	37
7 – CONCLUSÃO	40
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Tecnologia enzimática

Com o grande desenvolvimento de novas técnicas, diminuição dos custos e o crescimento da biotecnologia enzimática, o uso dos catalisadores químicos vem sendo substituído gradativamente por biocatalisadores. Os biocatalisadores, usualmente as enzimas, são moléculas biológicas que possuem propriedades catalíticas com habilidades de realizar transformações químicas específicas, além de serem consideradas ecologicamente corretas (KAUSHIK *et al.*, 2014). As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações bioquímicas nos organismos vivos. Esse tipo de proteína especializada pode ser obtida de fontes animais, vegetais e microbianas (ROBINSON, 2015). Apesar das vantagens ambientais das enzimas em relação aos métodos convencionais, existem algumas desvantagens do seu uso na área industrial e da saúde. Em altas temperaturas e com um grande desvio do pH leva à sua desnaturação, o que limita o uso dessas macromoléculas fora das condições fisiológicas. Devido ao alto custo de isolamento e purificação de enzimas, os processos químicos são mais praticáveis (SINGH *et al.*, 2016). Em consequência do surgimento da tecnologia do DNA recombinante e da engenharia de proteínas o uso micro-organismos para a expressão de enzimas mesmo para aplicações sofisticadas tornou-se economicamente viável, além de possibilitarem a melhoria das condições naturais, como resistência à temperatura e pH (CHERRY; FIDANTSEF, 2003).

A partir de 1940 com o grande avanço da bioquímica, um grande número de enzimas foi isolado e caracterizado. Assim sendo, a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) em consulta com a *Union for Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) criou a *Enzyme Commission* (EC) para ficar encarregada de categorizar as enzimas de acordo com a sua função (SINGH *et al.*, 2016). A EC utiliza o sistema de quatro dígitos para a classificar a função enzimática de várias enzimas. O primeiro dígito é referente às seis classes de enzimas (oxidoredutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase) (tabela 1). A subclasse, o segundo dígito, geralmente contém a informação sobre o tipo de composto ou grupo envolvido. O terceiro dígito especifica o tipo de reação envolvida. E o quarto dígito é o número de série que identifica a enzima individualmente (MCDONALD; TIPTON, 2014).

Tabela 1: Classe das enzimas e os tipos de reações correspondentes (modificado SINGH *et al.*, 2016)

Número	Classe	Reação
1	Oxidoredutase	Realiza a transferência de elétrons de uma molécula para outra.
2	Transferase	Faz a transferência de um grupo de átomos de uma molécula para outra.
3	Hidrolase	Catalisa a hidrólise, a clivagem do substrato pela água.
4	Liase	Remove grupos dos seus substratos formando duplas ligações, ou que convertem grupos adicionados a duplas ligações.
5	Isomerase	Catalisa a transferência de grupos de uma posição para outra na mesma molécula.
6	Ligase	Une moléculas através de ligações covalentes.

Com o desenvolvimento de novas técnicas de expressão e purificação de enzimas, a quantidade de aplicações aumentaram, e com a disponibilidade de enzimas termoestáveis surgiram várias possibilidades em setores industriais, como farmacêuticos, alimentícios, combustíveis, papel e celulose, e têxtil (HAKI; RAKSHIT, 2003). Das seis classes de enzimas, as hidrolases são as mais numerosas além de serem alvos de estudos da engenharia de proteínas, em razão de serem os biocatalisadores mais utilizados (PORTER *et al.*, 2016). Porém os processos de conversão química e bioquímica envolvem também as reações redox, um modelo menos explorado, e desse modo um estudo aprofundado das oxidoredutases é crucial para a biotecnologia industrial (MARTINEZ *et al.*, 2017).

1.2 – Oxidoredutases

As oxidoredutases são enzimas que catalisam a transferência de elétrons de uma molécula a outra. Em geral ocorrem duas meias reações (uma oxidativa e uma redutiva) e pelo menos dois substrato (um redutor e um oxidante) são ativados (XU, 2005). Durante essa reação, as oxidoredutases costumam se ligar fortemente a cofatores (in)orgânicos para sua atividade catalítica (CHANIQUE; PARRA, 2018). No entanto, algumas reações podem ser catalisadas por oxidoredutases que não necessitam de cofatores, e comumente essas enzimas contêm vários resíduos aromáticos no seu sítio ativo para serem cataliticamente ativas (PAZMIÑO *et al.*, 2010).

Grande parte das oxidorreductases são dependentes de cofatores como heme, flavina e íons metálicos, para catalisar a reação de oxido-redução. Nessa reação, o agente oxidante oxida o substrato, enquanto que o cofator funciona como aceptor de elétrons, além de auxiliar a enzima durante a catálise (GYGLI; BERKERL, 2015).

A classe das oxidorreductases é dividida em 22 subclasses com base no tipo de reações que catalisam, no entanto uma classificação mais geral foi proposta e dividida em quatro subgrupos, a saber: (1) oxidases; (2) peroxidases; (3) oxigenases; (4) desidrogenases (XU, 2005, PAZMIÑO *et al.*, 2010). Essa grande classe de enzimas apresenta propriedades significativas e tem sido explorada em vários campos, como na descolorização de corantes, indústria de papel e polpa, biorremediação, entre outras (ALNEYADI *et al.*, 2018).

1.3 – Celobiose desidrogenase

A celobiose desidrogenase (CDH, EC 1.1.99.18) é uma enzima extracelular da classe das oxidorreductases secretada por fungos degradadores de madeira. Essa enzima foi descoberta em 1974 no sistema enzimático extracelular do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e posteriormente em outras espécies de fungos (LUDWIG *et al.*, 2018). Esta enzima é secretada por vários fungos que pertencem à classe I (filo *Basidiomycota*) e classe II e III (filo *Ascomycota*). Dependendo da classe as propriedades catalíticas específicas permitem a oxidação de diferentes substratos por diferentes CDHs. Embora todas as CDHs tenham grande preferência por substratos que são compostos por pelo menos dois resíduos de açúcares ligados pela ligação β -1,4, elas dificilmente oxidam monossacarídeos (KRACHER *et al.*, 2016).

1.3.1 – Características físicas

As CDHs pertencem a um grupo heterogêneo de proteínas com aproximadamente 800 aminoácidos, dependendo da sua origem as propriedades bioquímicas desta enzima pode variar em pH ótimo, ponto isoelétrico (aproximadamente pH 5) e tamanho (entre 80 a 100kDa) sobretudo do grau de glicosilação, o qual pode representar até 20% da massa molecular (CIPRI *et al.*, 2016). Uma das características em particular é a sua composição: a combinação do domínio desidrogenase (DH), que contém flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como cofator e sítio de ligação do substrato, ao domínio citocromo (CYT) que

contém o grupo prostético heme-b, unidos por uma sequência *linker* conectando os dois domínios (TAVAHODI *et al.*, 2018).

Durante a oxidação da celobiose em ácido celobiônico pelo domínio DH, dois elétrons são retirados do átomo de carbono na posição C1 e doados ao cofator FAD. Esses elétrons podem ser transferidos para um ou dois aceptores de elétrons (AE) reduzindo diretamente o FADH₂. Da mesma forma esses elétrons podem ser transferidos por transferência intramolecular de elétrons (IET, *intramolecular electron transfer*) ao cofator heme b localizado no domínio CYT, que atua como um mediador entre o DH e o aceptor de elétrons final (LUDWIG *et al.*, 2013; TAVOHODI *et al.*, 2017) (figura 1).

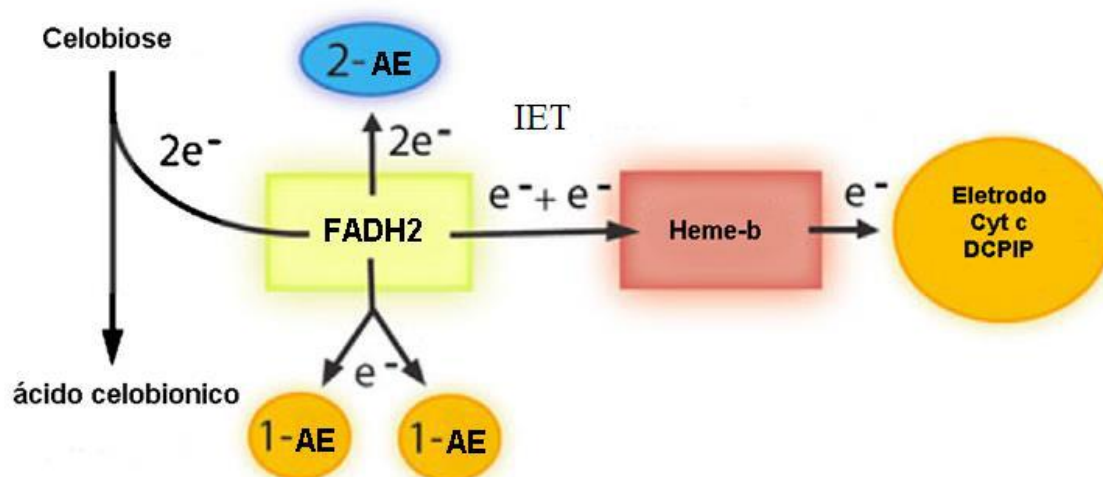


Figura 1: Vias de transferência de elétrons do substrato pelo domínio DH para diversos receptores de elétrons (adaptado LUDWIG *et al.*, 2013).

Embora a descrição das CDHs date da década de 70, o mecanismo de catálise só foi elucidado em 2015 com a resolução do cristal da CDH de *Myriococcum thermophilum* (código de acesso do PDB 4QI6) (TAN *et al.*, 2015). Este foi um grande avanço tendo em vista que apenas as estruturas dos domínios DH e CYT do fungo *Phanerochaete chrysosporium* foram resolvidas separadamente, impedindo a elucidação da interação entre esses domínios dificultando a compreensão da IET (SCHULZ, 2015). A figura 2 representa a estrutura da CDH de *M. thermophilum* e seus aminoácidos nas regiões

catalíticas (W295, R698 e Y99) responsáveis pela montagem da cadeia de transferência de elétrons (TAN *et al.*, 2015).

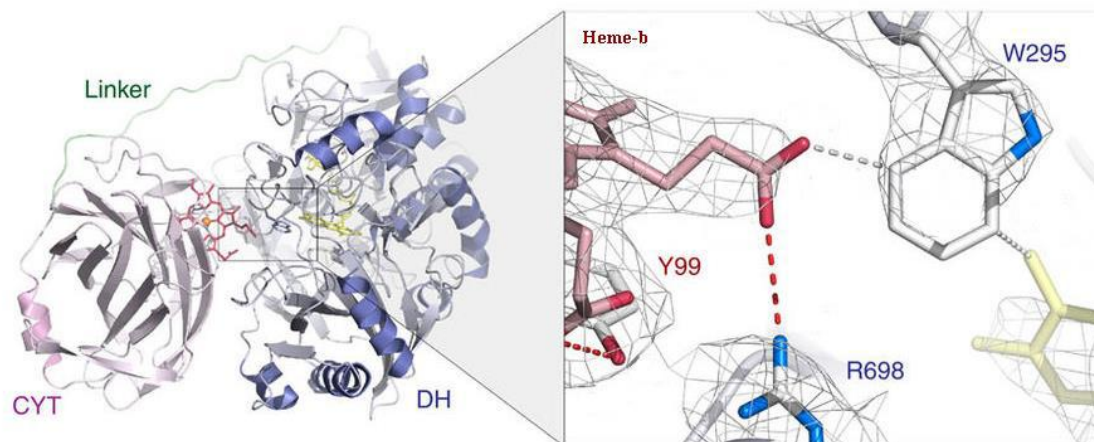


Figura 2: Estrutura da celobiose desidrogenase do fungo *Myriococcum thermophilum*: Domínio DH (azul) e domínio CYT (rosa). A região destacada mostra o grupamento heme (vermelho) dentro do domínio CYT e grupamento FAD (amarelo) dentro do domínio DH. O linker é indicado pela cor verde (adaptado TAN *et al.*, 2015).

1.3.2 – Função biológica

Dentre as funções da CDH podemos citar: acceptor de elétrons para fechar seu ciclo catalítico, redução de quinonas, O_2 , Fe^{3+} e Cu^{2+} (HARREITHER *et al.*, 2011). Sua função *in vivo* não é totalmente compreendida, mas a CDH é conhecida por desempenhar um papel importante durante a degradação da biomassa lignocelulósica. Durante o processo de degradação, a CDH usa a celobiose (produto da degradação da celulose pelas celulases) para reduzir radicais fenóis e quinonas, que são provenientes da degradação da lignina. Esse mecanismo é considerado por alguns autores como uma forma de defesa produzida pelos fungos para protegê-los de espécies tóxicas a base de lignina (NYANHONGO *et al.*, 2017).

Várias outras hipóteses sobre a degradação da biomassa lignocelulósica envolvendo a CDH têm sido propostas, incluindo a que a CDH pode diminuir a inibição dos substratos das celulases pela conversão da celobiose em ácido celobiônico. Além disso, a CDH pode dar o suporte para a manganês peroxidase pela produção do ácido celobiônico para quelar os íons de manganês a fim de reduzir a lignina (KRACHER; LUDWIG, 2016). Ainda assim, essas hipóteses devem ser analisadas com cuidado, pois nem todas as espécies que secretam a CDH produzem as mesmas enzimas lignocelulolíticas (LUDWIG *et al.*, 2010). A hipótese amplamente aceita sobre a

atividade da CDH sugere a sua participação na reação de Fenton para a criação de radicais hidroxilas reativos através da redução de compostos férricos (KRACHER; LUDWIG, 2016). Ao reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , o Fe^{2+} pode reagir com H_2O_2 , resultante da redução de O_2 pela própria CDH ou por outras enzimas produtoras de peróxido, gerando radicais hidroxilas capazes de degradar e modificar celulose, hemicelulose e lignina (FLITSCH *et al.*, 2013).

1.4 – Aplicações tecnológicas das CDH

Devido a particularidade do domínio CYT de transferir diretamente os elétrons para um aceptor de elétrons, a celobiose desidrogenase é uma oxidorreductase extracelular, com bom desempenho e que vem sendo estudada para aplicações em diversas áreas (NYANHONGO *et al.*, 2017), incluindo: a) confecção de células de biocombustível utilizando a CDH para catalisar reações que geram energia (TASCA *et al.*, 2008); b) agente de biorremediação para a degradação de poluentes recalcitrantes (LUDWIG; HALTRICH, 2002); c) agente de degradação de corantes residuais em processos na indústria têxtil, devido a habilidade de formar radicais hidroxilas, a CDH exibiu uma ação combinada com a lacase no processo de descoloração (CIULLINI *et al.*, 2008); d) aplicações na área médica para a inibição da formação de biofilmes utilizando a habilidade da CDH em reduzir O_2 em H_2O_2 *in situ*, onde ele age como desinfetante e antisséptico (NYANHONGO *et al.*, 2017); e) e a construção de biossensores a fim de substituir métodos invasivos de análise, como a detecção de açúcares (BOLLELLA *et al.*, 2017);

1.4.1 – Biossensores

Segundo a IUPAC um biossensor pode ser definido como “um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos usualmente por sinal elétrico, térmico ou ótico” (IUPAC, 2014). A composição de um biossensor consiste em a) um detector que percebe um sinal A no sistema a ser medido, b) um transdutor que converte o sinal A em um sinal B de mais fácil processamento, c) um sistema de processamento e interpretação e exibição do sinal (figura 3) (MARTINS *et al.*, 2013).

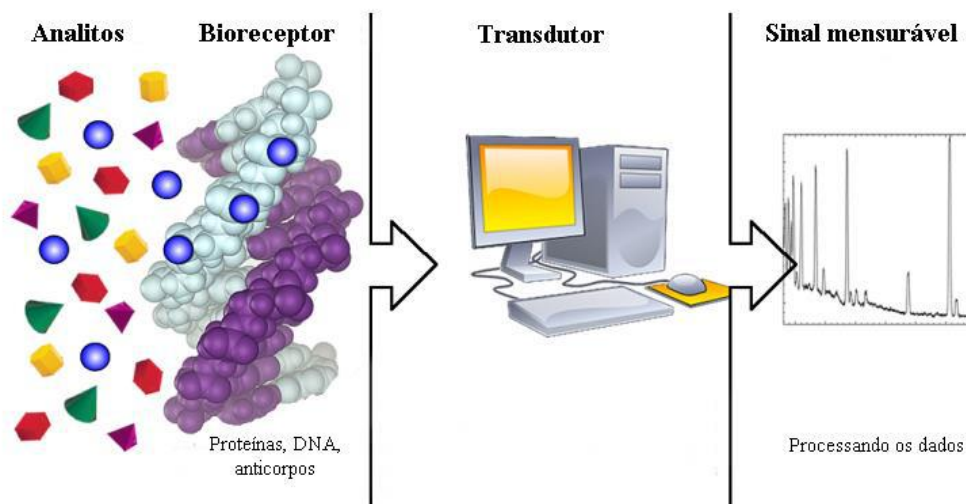


Figura 3: Esquema geral de um biossensor (adaptado de MARTINS *et al.*, 2013).

Os biossensores estão sendo aplicados em diversas áreas como a indústria alimentícia, ambiental, bioproteção e diagnóstico de saúde humana (KAVITA, 2017), sendo o mais comum os glicosímetros que são baseados na enzima glicose oxidase imobilizada do fungo *Aspergillus niger* e empregados para medição da concentração de glicose no sangue periférico (CHIN *et al.*, 2013).

Os biossensores são caracterizados pela alta seletividade e sensibilidade em razão da afinidade do material biológico com a sua molécula alvo (MEHROTRA, 2016). Em 1967 foi reportado o primeiro biossensor enzimático, e desde esta data os biossensores sofreram modificações na sua estrutura, e atualmente são definidos por três gerações (figura 4), sendo o de 3º geração, usando transferência direta de elétrons (DET, *direct electron transfer*), o mais promissor (FREIRE *et al.*, 2003).

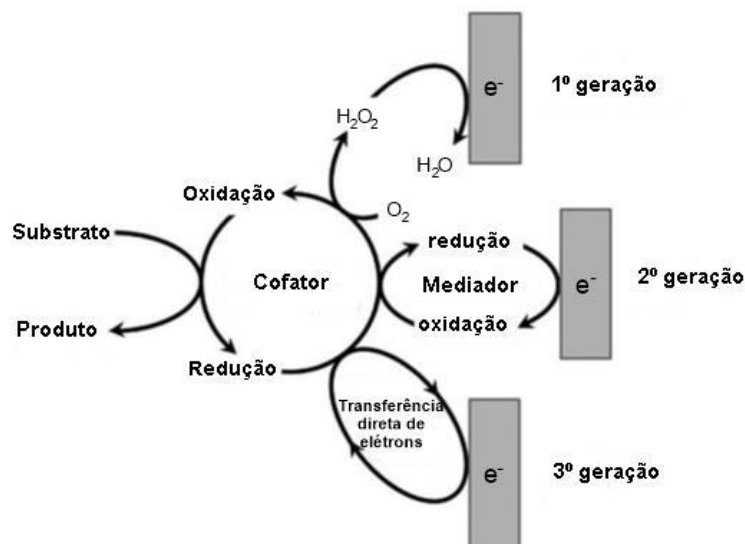


Figura 4: Mecanismos de resposta de diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos. 1º geração: baseia-se na diminuição na concentração de oxigênio ou aumento na concentração de peróxido de hidrogênio; 2º geração: utilizam mediadores na transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo; 3º geração: ocorre a transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo (adaptado DAS *et al.*, 2016).

Nessas estruturas ocorre a oxidação de um substrato pela enzima imobilizada no eletrodo, e os elétrons gerados pela oxidação são transferidos diretamente para o eletrodo onde a enzima está imobilizada, gerando um sinal elétrico (FREIRE *et al.*, 2003). Devido à natureza independente que elimina os mediadores, os biossensores baseados em DET são ideais para monitoramentos em tempo real, contínuos e análises de analitos *in vivo* (ZHAO *et al.*, 2017). Além disso, esse tipo de biossensor possui alta sensibilidade devido à integração da enzima com o eletrodo, e alta seletividade devido às interações entre a enzima e o substrato (FREIRE *et al.*, 2003).

Nesse sentido, as CDHs são promissoras para o desenvolvimento de biossensores devido as suas habilidades em transferir elétrons diretamente (BOLLELLA *et al.*, 2017). Portanto, a combinação do material e da engenharia enzimática tem um grande impacto no desenvolvimento de eletrodos modificados com CDH (LUDWIG *et al.*, 2013).

1.5 – Expressão em *Pichia pastoris*

Em virtude do alto preço da produção e purificação de enzimas nativas, o uso em grande escala em processos industriais muitas vezes ainda não é viável. Neste contexto a expressão heteróloga em um hospedeiro eucariótico, de fácil manipulação como a

levedura metilotrófica *Pichia pastoris* pode ser uma alternativa para a aplicação industrial (ZAMOCKY *et al.*, 2006).

O sistema de expressão em *P. pastoris* apresenta vantagens sobre outros sistemas de expressão eucariótico e procariótico, principalmente atribuída a facilidade de manipulação, inserção gênica de múltiplas cópias, forte atividade do promotor AOX1, e à sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais complexas que incluem formação de ligações dissulfeto e hiperglicosilação (YANG; ZHANG, 2018).

Dentre as modificações pós-traducionais, a glicosilação é a mais comum nas proteínas. A adição de moléculas de açúcares as cadeias polipeptídicas afeta as suas propriedades físicas incluindo a solubilidade, estabilidade, carga ou sensibilidade a proteólise (WALSKI *et al.*, 2017).

Os micro-organismos metilotróficos utilizam uma via específica para o metabolismo do metanol para a expressão de proteínas heterólogas. O promotor da álcool oxidase regula a expressão de uma enzima chave do metabolismo do metanol, a álcool oxidase (AO), que catalisa os primeiros passos da assimilação deste álcool, convertendo-o em formaldeído e peróxido de hidrogênio. Na *P. pastoris* existem dois genes que codificam para a AO: AOX 1 (~90% da atividade da AO) e AOX 2 (~10% da atividade da AO). Esses promotores são regulados positivamente pela presença de metanol no meio de cultura na ausência de glicose (YANG; ZHANG, 2018).

A produção de proteínas recombinantes é comumente realizada empregando cepas especializadas da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) otimizadas para a expressão heteróloga. No entanto as bactérias não são capazes de introduzir durante a síntese proteica nenhum dos tipos de glicosilação na cadeia peptídica sintetizada, o que pode gerar produtos de propriedades diferentes da proteína nativa obtida do hospedeiro natural eucariótico. Em contrapartida, a produção recombinante pelas leveduras *Pichia pastoris* gera comumente produtos hiper-glicosilados, o que pode também, através do aumento da distância entre os sítios catalíticos e a superfície de imobilização, afetar a eficiência da reação de transferência direta de elétrons (MA *et al.*, 2017).

2 – JUSTIFICATIVA

No decorrer dos últimos anos foi possível manipular o DNA para modificar e inserir genes em uma diversidade de hospedeiros, gerando organismos recombinantes ou geneticamente modificados. Esses organismos são comumente utilizados, entre muitas outras aplicações, para a produção de proteínas heterólogas, tendo em vista que estas proteínas podem possuir um grande valor comercial. Um avanço adicional foi a queda no preço com o avanço da tecnologia da produção *in chemico* de DNA, que permitiu que a pesquisa e desenvolvimento, além de eliminar a necessidade de isolar e purificar proteínas de interesse nativas do organismo de origem, permitiram superar também a necessidade de isolar as sequências codificantes diretamente do isolamento de transcritos do próprio organismo em estado metabolicamente ativo (BREITLING; TAKANO, 2016).

Dessa maneira, aproveitando o referido avanço tecnológico, uma proposta interessante é a produção da enzima celobiose desidrogenase em um sistema de expressão heteróloga no hospedeiro *Pichia pastoris*, para a avaliação da viabilidade do desenvolvimento de biossensores amperométricos baseadas em DET

Devido as propriedades catalíticas, as CDHs são frequentemente estudadas para a manipulação de diversas características, dentre elas os sítios de glicosilação. A adição dos açúcares podem impactar nas propriedades cinéticas e estabilidade das enzimas, visto que a glicosilação estabiliza muitas vezes a estrutura terciária da proteína aumentando a estabilidade e assim a meia vida (LUDWIG *et al.*, 2013). Em contrapartida, a glicosilação impacta na transferência de elétrons, tendo em vista que é necessário um contato íntimo entre a proteína e a superfície onde a mesma se encontra imobilizada. Assim, uma vez estabelecido o sistema de medição, será avaliado o potencial ganho de desempenho com a desglicosilação controlada da proteína recombinante via manipulação dos sítios de glicosilação através de mutação sítio-dirigida.

Desta forma este trabalho é o início de uma grande abordagem da engenharia de proteínas em criar enzimas mutantes, através da eliminação dos sítios potenciais de glicosilação, tendo como modelo a celobiose desidrogenase 1 de *Neurospora crassa*. Contudo, antes da produção das enzimas mutadas é necessário gerar de forma consistente e em quantidades e qualidades adequadas a enzima recombinante selvagem.

3 – OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir heterologicamente e avaliar o desempenho da NcCDH recombinante selvagem.

3.1 – Objetivo específico

- Sub-clonagem do DNA sintético contendo a sequência codificante completa em vetor de expressão para expressar heterologicamente em levedura;
- Transformação de levedura com a construção
- Avaliação da expressão heteróloga via monitoramento da atividade da redução do DCPIP

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Materiais e reagentes

Os reagentes e insumos de meio de cultura empregados foram de grau analítico ou superior; *E. coli* DH5 α , Zeocina, dNTP 100mM e RNase A foram obtidos da *Thermo Scientific*. SacI foi obtida da *New England Biolabs*. EcoRI foram obtidos da *Fermentas*. *TransStart FastPfu* foi obtida da *Transbiotech*. *5x In-fusion enzyme mix* foi obtido da *Clontech*. GenElute™ PCR Clean-Up kit foi obtido da *Sigma Aldrich*. O vetor pPICZalpha C e o clone X-33 de *Pichia pastoris* (*Thermo Scientific*) foram gentilmente cedidos pela Dra. Eleonora Kurtenbach (IBCCF, UFRJ).

4.2 – Obtenção da sequência de NcCDH wt

Para aumentar a produção da proteína recombinante CDH e suas variações em *Pichia pastoris*, foi realizado uma otimização de códons utilizando a sequência codificante da CDH 1 do fungo *Neurospora crassa* (>gi|758991975|ref|XM_951498.2|*Neurospora crassa* OR74A *cellobiose dehydrogenase* (cdh-1), mRNA) de acordo com os códons específicos usados para *P. pastoris* (IDT Codon Optimization tool, www.idtdna.com) e introduzindo no C- terminal uma sequência de clivagem para a TEV protease, com o objetivo de remoção posterior do tag de purificação *downstream* ao sítio

TEV. A sequência de interesse proposta foi desenhada no software SnapGene e adquirida comercialmente da Genscript clonada no vetor pUC57, para ser posteriormente subclonada no vetor de expressão selecionado

4.3 – Meios de cultura

Os componentes dos meios (tabela 2) foram dissolvidos em água ultrapura e esterilizados por autoclavação a 121°C por 15 minutos. No caso de meios sólidos, foi adicionado ágar bacteriológico (15 g/L). Em meios com glicose, a glicose foi esterilizada por filtração (0,22µm). A adição de metanol e glicose foi feita empregando manobras assépticas.

Tabela 2: Composição dos meios de cultura empregados

	NaCl (g/L)	Triptona (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	KCl (mM)	Glicose (M)	Peptona (g/L)	Sorbitol (M)	Glicerol (g/L)	Metanol (mL/L)
low salt LB	5	10	5	-	-	-	-	-	-
SOC	5	20	5	250	1	-	-	-	-
YPD	-	-	10	-	20	20	-	-	-
YPDS	-	-	10	-	20	20	1	-	-
YPG	-	-	10	-	-	20	-	10	-
YPM	-	-	10	-	-	20	-	-	10

4.4 – Primers

Todos os *primers* (tabela 3) foram sintetizados quimicamente (IDT®) e purificados pelo fornecedor via HPLC e dessalinização padrão. Segundo as informações do fabricante, os *primers* liofilizados foram dissolvidos em água livre de nuclease (estoque) e em seguida diluídos para uma concentração de 10µM. Todos os *primers* foram armazenados a -20°C.

Tabela 3: Lista dos *primers* utilizados e suas sequências.

<i>Primers</i>			
Nome	T _m °C	Sequência	
5'AOX1	55	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	
3'AOX1	56	GCAAATGGCATTCTGACATCC	
wt F 2709-2731 pPICz alpha Nc	56	AGTTAGAGGTGGTTAAGGCATCT	
wt F 1934-1953 pPICZ alpha Nc	56	GGAATTCCTGTCGCTGACAA	
wt F 3658-3685 pPICZalpha Nc	54	ATTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA	
wt R 2101-2122 pPICZ alpha Nc	56	GCAAGCAATACCATCACTGTCT	
wt R 2931-2948 pPICZalpha Nc	55	GTCCGATGTTAGGGGCAG	
wt R 1164-1187 pPICZalpha Nc	55	CGAGAGATACCCCTTCTTCTTTAG	
Nc CDH bloco 1 F	55	CTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCG	
Nc CDH bloco 1 R	54	TCAAACGAGTTAAGGATGTATTATCAA	
Nc CDH bloco 2 F	54	TTGAATAATACATCCTTAACTCGTTTTGA	
Nc CDH bloco 2 R	53	TAAAAAGTGACATTGTTGTGTTGT	
Nc CDH bloco 3 F	54	TAATACAACACAACAATGTCACTTTTT	
Nc CDH bloco 3 R	54	TTCTGAGATGAGTTTTTGTCTAGAAAT	

4.5 – Obtenção da sequência codificante da CDH selvagem recombinante por PCR

O vetor pUC57 com o fragmento liofilizado foi dissolvido em tampão TE, separado em alíquotas e em seguida diluído para uma concentração de 5 ng/μL. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C.

A alíquota diluída foi utilizada como molde para amplificar por PCR o fragmento contendo a sequência de interesse e os sítios de sobreposição com o vetor de expressão para *in fusion cloning* utilizando os *primers* e componentes mencionados na tabela 4:

Tabela 4: Componentes da PCR para amplificar o fragmento.

Componentes	Volume
5x <i>TransStart FastPfu</i> Buffer	10 μ L
dNTP 10 mM	1 μ L
<i>TransStart FastPfu DNA Polymerase</i> (2,5 U/ μ L)	1 μ L
Nc CDH bloco 1F	1 μ L
Nc CDH bloco 3R	1 μ L
H ₂ O	35 μ L
pUC 57 (5 ng/ μ L)	1 μ L
Total	50 μL

A reação foi submetida às seguintes condições em um termociclador (Applied Biosciences Veriti): 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 2:30 minutos; e 10 minutos de extensão final a 72°C.

Após a amplificação e monitoramento em eletroforese de gel de agarose (1% em tampão TAE, 5V/cm, com visualização pós-corrida empregando coloração por Gel Red em transiluminador Bio-Rad Gel-Doc XR) o fragmento NcCDH wt foi purificado via precipitação etanol-acetato e centrifugação (Hettich Mikro 200 26536g por 10 minutos), ressuspenso em água livre de nuclease, quantificado via espectrofotômetro UV (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) e armazenado a -20°C até o uso.

4.6 – Amplificação do vetor

Para aumentar a eficiência da transformação com a redução do *background* de vetor vazio, o vetor de expressão pPICZalpha C foi linearizado via PCR; o fragmento amplificado do vetor pPICZalpha C desenhado contém a marca de resistência a zeocina *BleoR*; sequência sinal de secreção do fator α de *Saccharomyces cerevisiae*; tag C-Myc; cauda de Histidina. O vetor vazio, obtido previamente por lise alcalina de clone de *E.coli* DH5 α , foi utilizado como molde na PCR. Os componentes da reação são apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Componentes da PCR para amplificar o plasmídeo

Componentes	Volume
5x <i>TransStart FastPfu</i> Buffer	10 μ L
dNTP 10 mM	1 μ L
<i>TransStart FastPfu DNA Polymerase</i> (2,5 U/ μ L)	1 μ L
wt F 3658-3685 pPICZalpha Nc	1 μ L
wt R 1164-1187 pPICZalpha Nc	1 μ L
H ₂ O	35 μ L
pPICZalpha C (5 ng/ μ L)	1 μ L
Total	50 μ L

A reação foi submetida às seguintes condições em um termociclador: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 3 minutos; e 10 minutos de extensão final a 72°C. O produto do PCR foi purificado, quantificado e monitorado por eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

4.7 – Obtenção dos plasmídeos contendo sequência codificante completa da CDH recombinante por ligação independente de clonagem

Após o vetor ter sido amplificado, a sequência NcCDH wt foi unida ao produto de PCR do vetor através do mix de enzimas da Clontech (*In-fusion HD*[®]), onde as extremidades complementares se anelam. A concentração utilizada da PCR do vetor foi de 100 ng/ μ L, enquanto que a da sequência selvagem foi de aproximadamente 150 ng/ μ L. A reação ocorreu em um termociclador a 50°C por 15 minutos, e os componentes são apresentados na tabela 6:

Tabela 6: Componentes da reação *In-fusion*

Componentes	Volume
5x <i>In-Fusion HD</i> Enzyme	2 μ L
PCR do pPICz α C (100 ng)	1,5 μ L
NcCDH wt (150 ng)	2,25 μ L
H ₂ O	4,25 μ L
Total	10 μ L

4.8 – Transformação e seleção dos clones de *E. coli*

Os produtos de clonagem gerados no tópico 4.7 foram introduzidos em células *E. coli* DH5 α quimicamente competentes conforme protocolo a seguir. O produto gerado pela reação com *In-Fusion* foi adicionado a uma alíquota de bactéria quimicamente competente, e incubados em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico quando foram colocadas a 42°C por 90 segundos em banho-maria. Logo após, as células voltaram ao banho de gelo onde permaneceram por 5 minutos. Foi adicionado então 1 mL de meio SOC às bactérias e em seguida as mesmas foram mantidas sob agitação a 37°C por 2 horas. As bactérias foram plaqueadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio *low salt* LB ágar com 25 μ g/mL de zeocina e cultivadas por um dia a 37°C. As colônias obtidas foram cultivadas em meio *low salt* LB líquido com 25 μ g/mL de zeocina, para que 24 horas depois fossem submetidas a minipreparação plasmídial via lise alcalina conforme protocolos usuais.

A partir do DNA plasmidial extraído foi realizado um *screening* por PCR a fim de confirmar a presença e integridade do inserto no vetor do clone selecionado. Para isso, foram utilizados os *primers*: wt F 1094-1119 pPICZ alpha Nc e wt R 2101-2122 pPICZ alpha NC (junção vetor – NcCDH 2), wt F 2709-2731 pPICz alpha NC e wt R 3674-3706 pPICZ alpha Nc (junção NcCDH 2 – vetor) com os seguintes componentes conforme a tabela 7.

Tabela 7: Componentes da PCR para verificar a integração dos fragmentos ao vetor

Componentes	Volume
10x PCR buffer	1,2 μ L
dNTP 10 mM	0,3 μ L
MgCl ₂ 50 mM	0,72 μ L
Taq selvagem	1,5 μ L
<i>Primer forward</i> 10 mM	0,3 μ L
<i>Primer reverse</i> 10 mM	0,3 μ L
H ₂ O	6,68 μ L
Template (1ng/ μ L)	1 μ L
Total	12 μ L

A reação foi submetida às seguintes condições em um termociclador: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 1:30 minutos; e 5 minutos de extensão final a 72°C. Além disso, em paralelo a PCR foi

realizado uma digestão com EcoRI no plasmídeo para avaliação do tamanho. Os produtos das PCRs e da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% conforme descrito no tópico 4.8.

4.9 – Midipreparação de DNA plasmidial

Após a confirmação do tamanho da plasmídeo pela digestão e pela PCR, uma alíquota da colônia isolada e do plasmídeo pPICZalpha C (vazio) foram inoculadas em 50 mL de meio *low salt* LB contendo 25 µg/mL de zeocina, incubadas *overnight* a 37°C a 225 rpm na incubadora *shaker* (New Brunswick™ Innova® 42/42R), e então centrifugadas por 10 minutos a 22410 g a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de solução I (50 mM de glicose; 10 mM de EDTA; 25 mM de Tris-HCl pH 8,0). Adicionou-se 400 µL da solução II (1% SDS; 0,2 N de NaOH), depois foi misturado por inversão e colocados no gelo por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 300 µL da solução III (3 M de acetato de sódio pH 4,8) para neutralizar a reação. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 5 minutos a 22410 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo e o DNA precipitado com 1 mL de isopropanol. O DNA foi centrifugado por 5 minutos a 22410 g, o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 1 mL de etanol 70%. Após a centrifugação, o DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 200 µL de água livre de nuclease contendo 1 µL de RNase A (20 µg/mL). Esse material, posteriormente, foi dosado no espectrofotômetro UV e estocado a -20°C.

4.10 – Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado a partir de 150 ng de DNA plasmidial purificado por lise alcalina empregando 10 pmol de *primers* e a química BigDye 4.0 *Cycle sequencing Termination* kit em um analisador genético ABI 3500dx (Applied Biosciences), empregando os protocolos-padrões. O sequenciamento foi realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda (Curitiba, PR).

4.11 – Digestão do DNA com SacI

Após purificação do DNA proveniente da midipreparação, os materiais foram digeridos 20U de SacI (NEB) no tampão NEBuffer 4 e 100 µg/mL de BSA em 10 µL, por 16h a 37°C. Aproximadamente 2 µg de DNA por construção foi digerido para a próxima etapa de transformação na *Pichia pastoris*.

4.12 – Preparo das *Pichia pastoris* eletrocompetentes e transformação

Uma alíquota da levedura *Pichia pastoris* foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada *overnight* a 30°C. No dia seguinte, 200 µL do pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio YPD por aproximadamente 20 horas até atingir uma DO₆₀₀ de 1,3-1,5. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g a 4°C (Thermo Scientific Sorvall Legend XF) e ressuspensas em 500 mL de água destilada estéril gelada. As células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em 250 mL de água destilada estéril gelada. Em seguida, foi realizada mais uma centrifugação e o *pellet* foi ressuspensado em 20 mL de sorbitol 1 M. Novamente centrifugadas, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1M.

Para a transformação foram utilizadas 80 µL das células e aproximadamente 2 µg do DNA de interesse (previamente linearizado). A mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm e incubada no gelo por 5 minutos. A eletroporação foi realizada utilizando o eletroporador (Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad) de acordo com os parâmetros para *Pichia pastoris* (25 µF, 200 ohm, 2000 V). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M na cubeta, e homogeneizado com as células eletroporadas. A suspensão foi transferida para um tubo de 15 mL, o qual ficou incubado 2 horas a 30°C sem agitação. Logo após a incubação, 25 µL de células foram plaqueadas em meio YPDS contendo 100 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias ou até o aparecimento de colônias.

4.13 – Seleção dos clones (screening dos transformantes)

Com as colônias formadas, um novo plaqueamento foi feito em meio YPDS utilizando 10 vezes a concentração ideal de zeocina (1000 µg/mL). A placa foi dividida

em quadrantes (figura 5) e em cada quadrante foi inoculada uma colônia escolhida aleatoriamente da placa de transformação. A placa foi incubada a 30°C durante 3 dias.

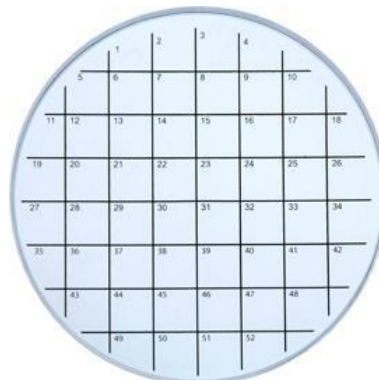


Figura 5: Esquema simplificado de uma placa de petri dividida em quadrantes.

4.14 – Cinética de crescimento

Das colônias obtidas na placa, uma colônia transformada com o plasmídeo contendo a sequência selvagem NcCDH (*wildtype - wt*) e uma transformada com o plasmídeo pPICZalpha C vazio foram cultivadas *overnight* em 50 mL de meio YPG a 30°C a 220 rpm em triplicata. Paralelamente, para servir de controle, a colônia de *Pichia pastoris* não transformadas foi cultivada nas mesmas condições acima. No dia seguinte, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio YPM, e cultivadas nas mesmas condições que no meio YPG. Durante o crescimento das leveduras, foram retiradas alíquotas de 1 mL para ensaios enzimáticos frente ao DCPIP. As alíquotas foram retiradas no tempo 0, 3, 6, 24, 30, 48 horas pós inoculação. Nos tempos de 0 e 24 horas foram adicionados 0,5% de metanol para induzir a expressão de proteína, e 1 mL de meio YPM estéril para repor a perda de volume.

4.15 – Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi realizado medindo a redução do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) a 515 nm ($\epsilon=6,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A reação de 200 μL foi composta por 100 μL do sobrenadante da cultura (dos tempos 0, 3, 6, 24, 30, 48 horas), 75 μL de 200 mM acetato de sódio, 1,5 μL de 20 mM DCPIP, 1,5 μL de 200 mM celobiose como substrato e 22 μL de água ultrapura. A medição foi feita em duplicata e realizada em um espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) no

comprimento de onda 515 nm. A cinética durou 3 minutos, com leituras a cada 30 segundos. A atividade enzimática foi expressa em U, onde 1 U = redução de 1 μ mol de DCPIP por minuto. Os resultados foram plotados em um gráfico utilizando o *software GraphPad Prism 7.00*.

5 – RESULTADOS

5.1 – Construção do vetor de expressão recombinante

O gene sintético codificador para a celobiose desidrogenase de *Neurospora crassa* foi obtido com base na sequência obtida no GenBank (XM_951498.2), substituindo os códons nativos pelos códons mais frequentes encontrados nos genes da *P. pastoris*. Embora a sequência original de aminoácidos tenha-se mantido, a sequência com códons otimizados visa uma melhora na tradução da proteína heteróloga dada a otimização para a frequência de uso dos códons no hospedeiro selecionado. O plasmídeo adquirido PUC57-NcCDHwt teve a sequência confirmada pelo fornecedor por digestão (EcoRI, HindIII), PCR e sequenciamento de Sanger.

Durante o desenho da sequência foi introduzido um sítio de clivagem para a TEV protease de modo a separar, a proteína de interesse das marcas C-myc e 6-His, oriundos do vetor de clonagem (pPICZ α C) (figura 6).

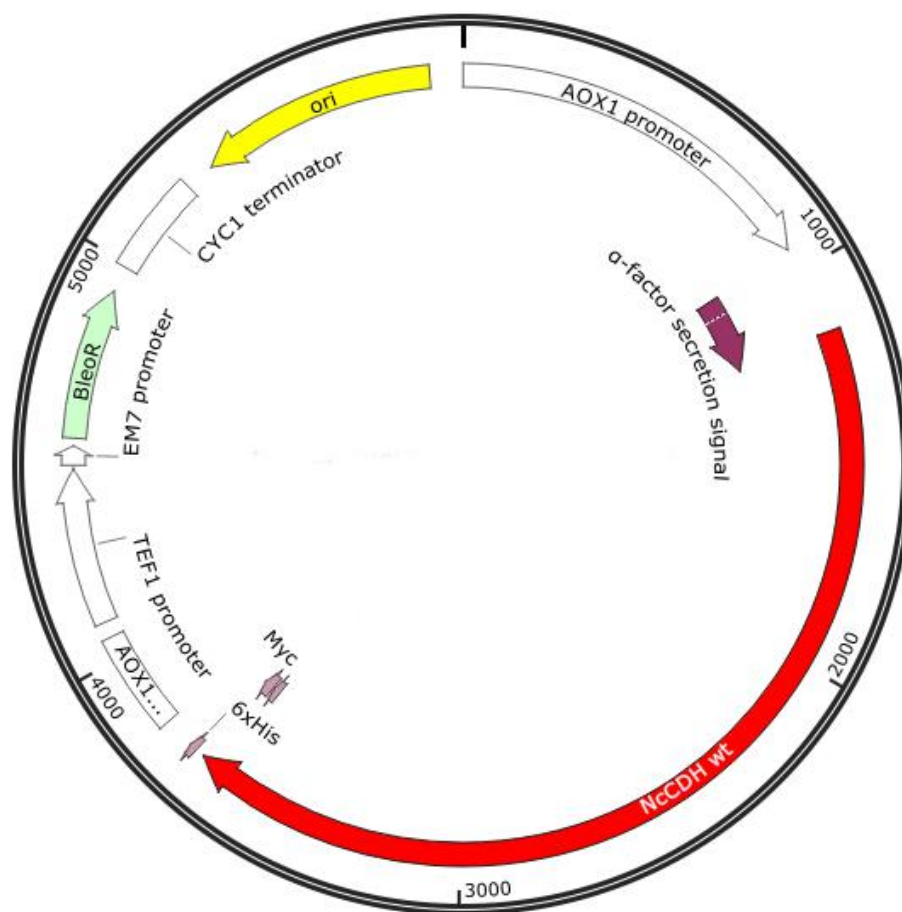


Figura 6: Vetor de

clonagem: Mapa do vetor de clonagem contendo a sequência-alvo (NcCDH), origem de replicação, marca de resistência da zeocina e o promotor para álcool oxidase. A figura foi obtida a partir do software Snapgene v 2.3.6 (Snapgene Inc LLC).

5.2 – Clonagem da CDH e transformação em *Pichia pastoris*

Para a clonagem da sequência de interesse no vetor de clonagem selecionado foi realizado à amplificação por PCR utilizando como molde, respectivamente o plasmídeo pUC57 adquirido comercialmente contendo a sequência de interesse (2500 pb), (figura 7 poço 2) e o plasmídeo pPICZαC (3500 pb) (figura 7 poço 3).

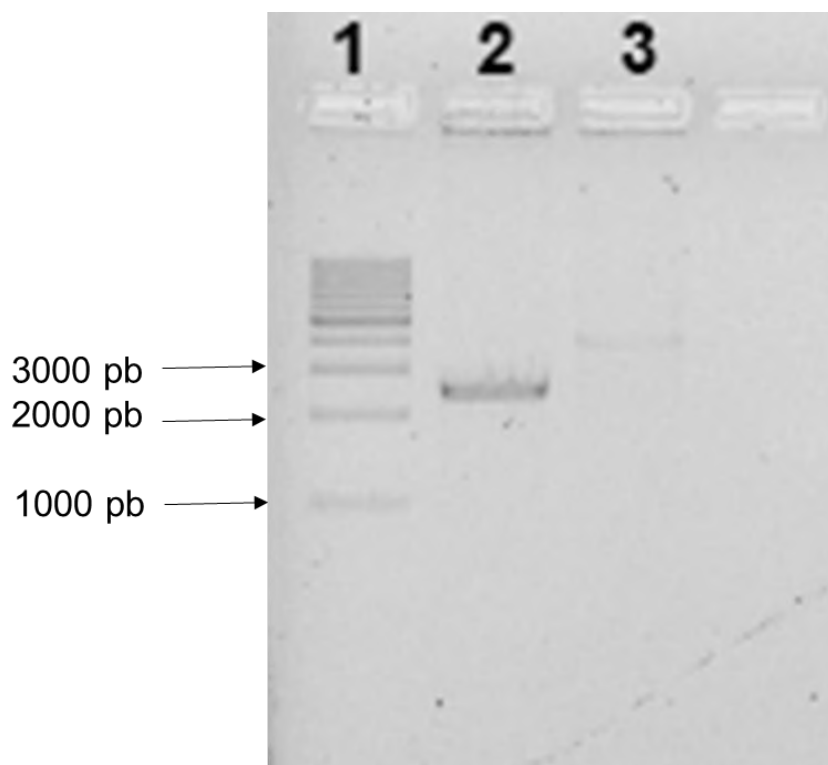


Figura 7: Gel de agarose 1% com amostra das PCRs. 1 – Marcador de peso molecular 1kb; 2 – PCR do vetor pUC57 utilizando *primers* Nc CDH bloco 1F e Nc CDH bloco 3R; 3 – PCR do vetor pPICZalphaC vazio utilizando os *primers* wt F 3658-3685 pPICZalpha Nc e wt R 1164-1187 pPICZalpha Nc. Gel pós-corado com gel red.

Com o sucesso das PCRs foi realizado o método de clonagem baseado no reconhecimento das extremidades complementares de um inserto com o vetor linearizado (In-Fusion HD, Clontech).

Após a clonagem, foi feita a transformação com a construção selvagem (NcCDH wt). Para confirmar a integração do vetor com o fragmento inteiro e na orientação correta, foi realizado PCR de colônia em clones buscando amplificar o início do vetor – NcCDH 2 e NcCDH 2 – final do vetor (figura 8A). Além disso, foi realizado uma digestão dos plasmídeos com a enzima EcoRI (figura 8B). O produto da digestão mostra uma banda forte aproximadamente em 6 kb indicando que o fragmento inteiro está inserido no vetor (previsto 5983pb).

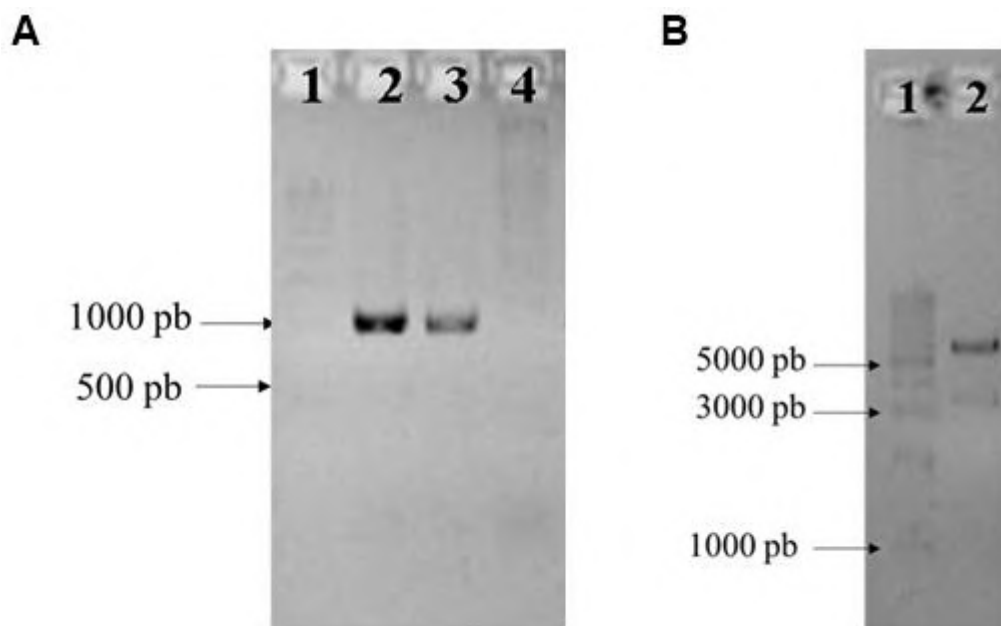


Figura 8: Monitoramento dos plasmídeos: a) Gel de agarose 1% com amostra da PCR da construção NcCDH wt. 1 – Marcador de peso molecular 500 pb; 2 – PCR do clone contendo o plasmídeo NcCDH wt utilizando *primers* wt F 1094-1119 pPICZ alpha Nc e wt R 2101-2122 pPICZ alpha Nc; 3 – PCR do clone contendo o plasmídeo NcCDH wt utilizando os *primers* wt F 2709-2731 pPICZ alpha Nc e wt R 3674-3706 pPICZ alpha Nc; 4 – Controle negativo. b) Gel de agarose 1% da digestão do plasmídeo com a enzima EcoRI da construção NcCDH wt. 1 – Marcador de peso molecular 1000 pb; 2 – Digestão da amostra NcCDH wt. Gel pós-corado com gel red.

Confirmados os indícios de que o plasmídeo teria o inserto completo na orientação correta, foi realizado uma midipreparação plasmidial das amostras NcCDH wt para obtenção do plasmídeo na concentração de DNA adequada para o processo de linearização dos mesmo com SacI e posterior transformação das leveduras. Como controle, paralelamente o plasmídeo pPICZ α C vazio foi processado da mesma forma. Ao mesmo tempo, as amostras dos plasmídeos foram sequenciadas objetivando confirmar a identidade das sequências e confirmar a ausência de mutações que poderiam prejudicar o processo *downstream* (inserções, deleções, transições afetando a sequência, o quadro de leitura ou gerando *stop-codons* precoces).

A análise do sequenciamento do plasmídeo proveniente da midipreparação com a combinação de *primers forward* e *reverse* foi possível cobrir 100% da sequência da CDH no plasmídeo com *base calling* de alta qualidade PHRED >20 (figura 9). A análise dos trechos mostrou 100% de homologia com a sequência alvo de interesse com o alvo (XM_951498.2).

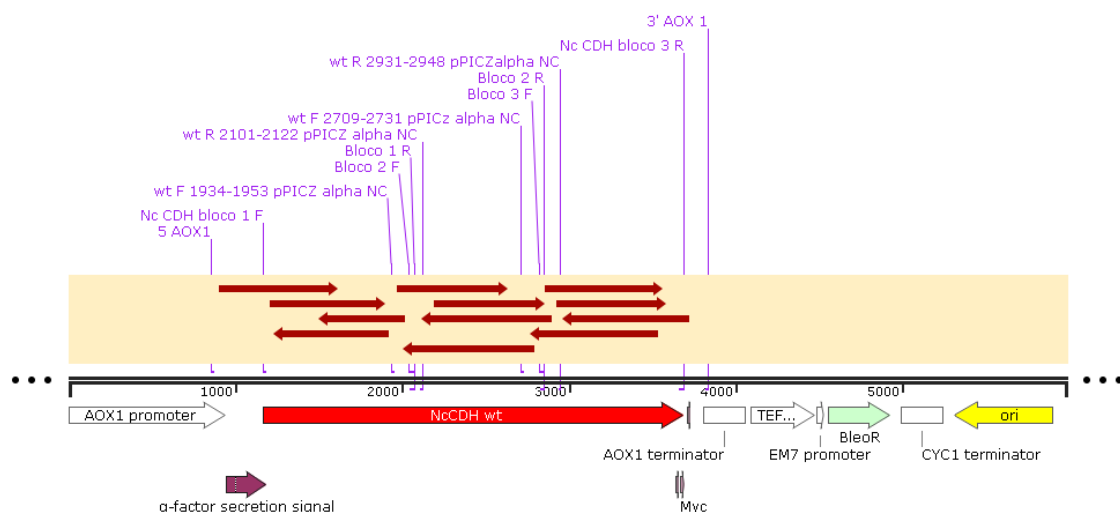


Figura 9: Mapa do vetor de expressão contendo a sequência-alvo e os *primers* utilizados para o sequenciamento. Setas indicam o tamanho das sequências cobertas utilizando *primers forward* e *primers reverse*.

A levedura *Pichia pastoris* possui a habilidade de integrar múltiplas cópias do DNA transformante via recombinação no seu genoma em locais com sequências homólogas (AOX1). Após a transformação e o plaqueamento, clones selecionados recuperados e os controles adequados foram semeados (figura 10) em meio contendo a concentração 10 vezes de zeocina (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de modo a selecionar preferencialmente os clones que integraram cópias múltiplas, o que poderia ser vantajoso para a etapa de expressão. Embora o mecanismo de múltiplas integrações não seja totalmente entendido, esses eventos são comuns entre as leveduras transformantes.

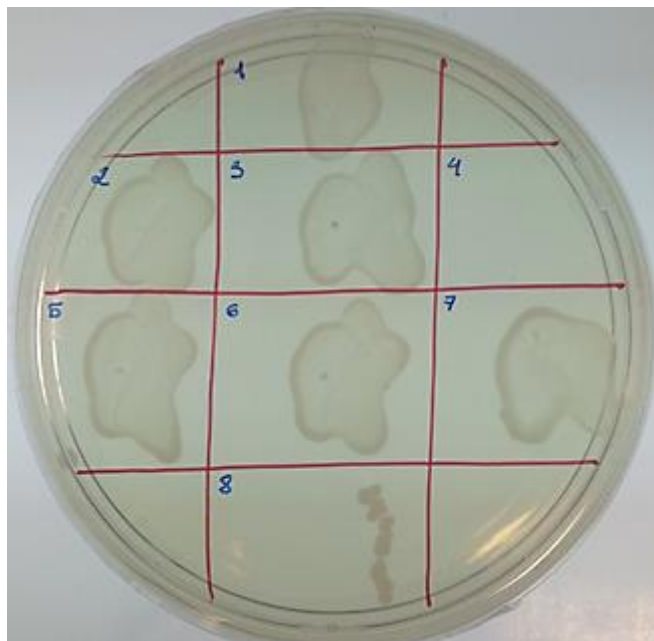


Figura 10: Ensaio de resistência a zeocina: Os diferentes clones de leveduras contendo as construções NcCDH wt (1, 2, 3, 5 e 6), *Pichia pastoris* não transformada (4) e pPICZαC transformado em *P. pastoris* (7 a 8) foram semeados em meio YPDS contendo 1000 µg/mL de zeocina para seleção de clones com mais resistência ao antibiótico.

5.3 – Expressão das CDHs e atividade

Os clones que apresentaram evidência de resistência aumentada à zeocina foram cultivados em meio YPG para que no dia seguinte pudessem passar por procedimento de indução da expressão heteróloga em meio líquido YPM. Para fazer a caracterização bioquímica, foi realizado uma cinética onde o sobrenadante foi coletado em diversas horas durante 2 dias, de 3 clones diferentes de *P. pastoris* NcCDH wt em triplicata. Durante o cultivo foram retiradas alíquotas para avaliar a atividade. Como controle foram tratados paralelamente clones de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPICZαC vazio e *Pichia pastoris* não transformada.

A atividade da CDH foi monitorada espectrofotometricamente pela diminuição da absorvância do DCPIP, utilizando como substrato a celobiose. A redução do DCPIP pelos elétrons da reação de oxidação provoca mudança de cor do azul (oxidado) em incolor (reduzido). Através do gráfico (figura 11) pode-se perceber que não houve a presença significativa da atividade em todas as amostras.

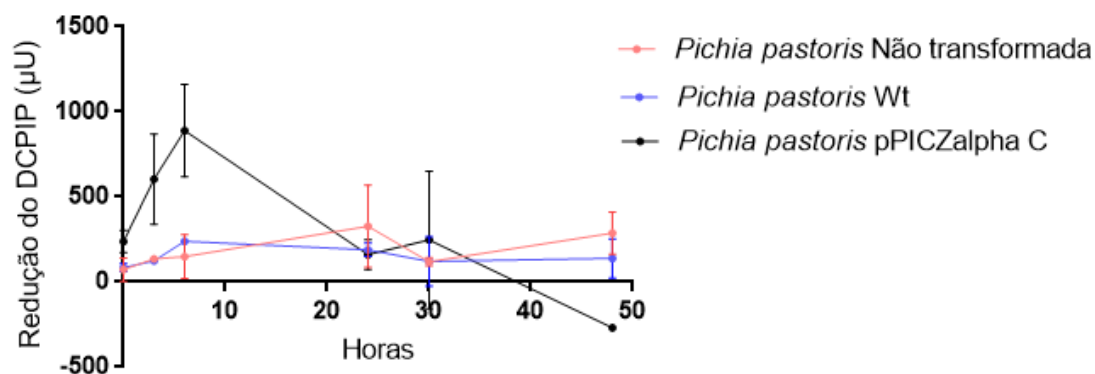


Figura 11: Cinética de redução do DCPIP: As proteínas extracelulares foram medidas através da redução do DCPIP (0,2 mM) utilizando a celobiose (2 mM) como substrato.

6 – DISCUSSÃO

A CDH é uma enzima com grande potencial tecnológico, incluindo sua aplicação na construção de biossensores eletrométricos. Este último representa uma alternativa mais econômica para diversas formas de análise (HARREITHER *et al.*, 2012; LUDWIG *et al.*, 2013; BOLLELLA *et al.*, 2017).

Diversos fungos filamentosos são capazes de produzir a CDH em quantidades satisfatórias durante o cultivo, no entanto a produção em larga escala e a purificação de proteínas nativas é em geral complexa. Por consequência, muitos estudos estão voltados para a clonagem do gene da CDH para expressão heteróloga em organismos hospedeiros como a *Pichia pastoris* (LUDWIG *et al.*, 2013), e inclusive na literatura alguns autores mostram êxito na expressão heteróloga do gene da CDH recombinante (YOSHIDA *et al.*, 2001, ZHANG *et al.*, 2011, BEY *et al.*, 2011, MA *et al.*, 2017).

Dependendo do tamanho do fragmento de DNA, o custo da síntese *in chemico* é relativamente alto, o que estimulou o grupo a buscar construção “modular” via *in fusion cloning* em trabalho anterior (COSTA; MEDEIROS, 2017). Embora esse método esteja bem descrito na literatura, nos deparamos com mutações indesejadas, possivelmente fruto de um número elevado de etapas de amplificação necessárias até a clonagem. Desta forma, a obtenção do gene inteiro foi pensada como forma de minimizar a possibilidade de surgimento de mutações na sequência de interesse durante a PCR e/ou as etapas de amplificação do plasmídeo em hospedeiro procariótico.

O processo de sequenciamento de DNA é capaz de determinar a ordem correta de nucleotídeos na molécula de DNA e é importante para validar as etapas *downstream* do processo. Para produzir uma proteína recombinante é desejável que não haja nenhum tipo de mutação na sequência de DNA, e é imprescindível que a mutação não altere o quadro de leitura ou crie um códon de parada, visto que a mutação pode impactar na síntese de forma completa ou na função da proteína (BROWN, 2002). O sequenciamento realizado cobriu 100 % da sequência, permitindo a confirmação da sequência e quadro de leitura.

A *Pichia pastoris*, com o passar dos tempos, se tornou um hospedeiro popular para expressão de proteínas recombinantes, sendo de fácil manipulação como a *E. coli* e a *Saccharomyces cerevisiae* mas com benefícios em termos de modificação pós-traducional comparada com a primeira e em termos de rendimento em comparação com a última. Uma das formas de aumentar o nível de expressão de proteínas de interesse é a otimização dos códons, etapa realizada antes da síntese gênica. Além disso, uma abordagem de aumento da eficiência da expressão e de fácil introdução (embora de difícil monitoramento) é a múltipla integração da construção contendo o gene alvo no genoma da levedura, pressionado seletivamente pelos clones de múltiplas cópias do gene de resistência BleoR (LI *et al.*, 2017).

Cabe observar, no entanto, que neste trabalho não foi possível otimizar as condições de fermentação. A atividade da CDH medida pela redução do DCPIP levou a resultados inconclusivos, sugerindo que o sinal identificado é composto somente pela resposta de compostos redutores inespecíficos presentes no meio de cultura. Uma outra hipótese é que algumas proteínas recombinantes complexas produzidas pela *P. pastoris* requerem a suplementação com cofatores. A incorporação insuficiente destes cofatores é considerada uma causa impeditiva na produção de proteínas recombinantes ativas. Desta maneira, uma forma de superar este gargalo é suplementar o meio de cultura com o cofator desejado ou seus precursores (KRAINER *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que o controle e checagem das etapas intermediárias não tenha apontado falhas, o que nos leva a crer que o esforço de otimização e/ou de seleção de novos clones pode levar à identificação de clones especialmente produtivos, visto que a posição de inserção do inserto no genoma pode induzir efeitos sobre a capacidade de expressão (ZHENG *et al.*, 2014).

A abordagem como um todo foi validada recentemente (COSTA; MEDEIROS, LJ, 2017) onde foi possível identificar no sobrenadante do cultivo a presença da NcCDH via a detecção de peptídeos relacionados via digestão trípica e espectrometria de massas,

embora com dados menos conclusivos sobre a redução de DCPIP. No entanto a tentativa recente de detectar via *Western blot* empregando anticorpo anti-His tag falhou em detectar o epítipo C-terminal mencionado.

Acreditamos portanto ser possível um aumento na produtividade investindo na otimização das condições de cultivo, empregando fermentadores que permitam monitorar e controlar parâmetros sabidamente importantes para os processos como concentração de oxigênio e fonte de carbono, e alimentando a batelada de forma contínua visando manter constante a concentração de componentes críticos no meio de cultivo em um estado estável, por exemplo a concentração de metanol, melhorando bastante o rendimento. Além disso, a degradação proteolítica pode ser um problema em alguns meios de culturas não tamponados. Algumas proteínas são suscetíveis a proteases endógenas, e este é um problema conhecido das CDH – a suscetibilidade do peptídeo *linker* à ação de proteases, separando as unidades CYT e DH (LUDWIG *et al.*, 2002; ZAMOCKY *et al.*, 2006). Neste caso, o uso de inibidores de protease nas etapas de subseqüentes à fermentação, uso de cepas de *Pichia pastoris* deficientes em proteases (ex. cepa SMD1168) ou o cultivo em pH ácido de modo a inibir a ação de proteases presentes no meio de cultivo podem aliviar o problema, de modo que a produção de proteínas seja otimizada (PLANTZ *et al.*, 2006).

O avanço deste trabalho com a otimização do processo de fermentação e a melhoria do processo de purificação vai permitir que esta dúvida seja dirimida. É digno de nota ainda que o sobrenadante do cultivo de *Pichia pastoris* não transformada apresenta atividade de redução de DCPIP que, ainda que tipicamente menor, é da mesma ordem de grandeza que os sobrenadantes dos meios de cultivo das leveduras recombinantes. Possivelmente alguma enzima nativa da *P.pastoris*, que usa FAD como cofator, está agindo nesses substratos e assim reduzindo o DCPIP (BONNER; VARNER, 2012).

Assim sendo os indícios corroboram para afirmarmos que temos plasmídeos contendo o inserto de interesse e leveduras resistentes à zeocina. Desse modo a estratégia de aprimorar o processo de fermentação e de purificação irá melhorar bastante o rendimento geral na obtenção das proteínas recombinantes de interesse.

7 – CONCLUSÃO

Em suma, observamos que a produção da CDH de *Neurospora crassa* se provou laboriosa e desafiadora, ainda assim a produção de enzimas recombinantes partindo de fragmentos de DNA puramente sintéticos e planejados se tornou viável, em oposição ao processo tradicional de obtenção de sequências codificantes a partir da purificação do RNA do organismo hospedeiro metabolicamente ativo. Essa metodologia nos permite modificar os sítios de glicosilação a fim de criar variantes da CDH através das ferramentas da biologia molecular.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALNEYADI, A.H.; RAULF, M.A.; ASHRAF, S.S. **Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water – a critical review.** Critical review in Biotechnology, 2018.

BEY, M.; BERRIN, J.G.; POIDEVIN, L.; SIGOILLOT, J.C. **Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes.** Microbial Cell Factories, v.10, 2011.

BOLLELLA, P.; GORTON, L.; LUDWIG, R.; ANTIOCHIA, R. **A third generation glucose biosensor based on cellobiose dehydrogenase immobilized on a glassy Carbon electrode decorated with electrodeposited gold nanoparticles: Characterization and application in human saliva.** Sensors, v.17, 2017.

BONNER, J.; VARNER, J.E. **Plant biochemistry.** Third Edition, Elsevier, 2012

BREITLING, R.; TAKANO, E. **Synthetic biology of natural products.** Cold Spring Harb Perspect Biol., v.8, 2016.

BROWN, T.A. **Mutation, Repair and recombination.** Genomes, 2nd edition, Oxford, 2002.

CHANIQUE, A.M.; PARRA, L.P. **Protein engineering nicotinamide coenzyme specificity in oxidoreductases: attempts and challenges.** Frontiers in Microbiology, v.14, 2018.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L. **Directed evolution of industrial enzymes: an update.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.14, p.438-443, 2003.

CHIN, C. D.; CHIN, S. Y.; LAKSANASOPIN, T.; SIA, S. K. **Low-cost microdevices for point-of-care testing.** *Point-of-care diagnostics on a chip*, p.3-21, 2013.

CIPRI, A.; SCHULZ, C.; LUDWIG, R.; GORTON, L.; VALLE, M. **A novel bio-electronic tongue using different cellobiose dehydrogenase to resolve mixtures of various sugars and interfering analytes.** *Biosensor and Bioelectronic*, v.79, p.515-521, 2016.

CIULLINI, I.; TILLI, S.; SCOZZAFAVA, A.; BRIGANTI, F. **Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes.** *Bioresource Technology*, v.99, p.7003-7010, 2008.

COSTA, L.J.M.; MEDEIROS, M.N. **Planejamento e produção de variantes de desglicosilação controlada da celobiose desidrogenase 1 de *Neurospora crassa*.** 2017. 92 f. Dissertação de Curso do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, 2017.

DAS, P.; DAS, M.; CHINNADAYYALA S.R.; SINGHA, I. M.; GOSWAMI, P. **Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications.** *Biosensors and Bioelectronics*, v.79, p.386-397, 2016.

FLITSCH, A; PRASETYO, E.N. **Cellulose oxidation and bleaching processes based on recombinant *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 60– 67, 2013.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. **Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity.** *Journal of the Brazilian chemical society*, v.14, p.230-243, 2003.

GYGLI, G.; BERKEL, W.J.H. **Oxizymes for biotechnology.** *Current Biotechnology*, v.4, p.100-110, 2015.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review.** *Bioresource Technology*, v.89, p.17-34, 2003.

HARREITHER, W.; SYGMUND, C.; AUGUSTIN, M.; NARCISO, M.; RABINOVICH, M.L.; GORTON, L.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R. **Catalytic Properties and Classification of Cellobiose Dehydrogenases from Ascomycetes**. Applied and Environmental Microbiology, v.77, p.1804-1815, 2011.

HARREITHER, W.; FELICE, A.K.G.; PAUKNER, R.; GORTON, L.; LUDWIG, R.; SYGMUND, C. **Recombinantly produced cellobiose dehydrogenase from *Corynascus thermophilus* for glucose biosensors and biofuel cells**. Biotechnology Journal, v.7, 2012.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2 edition 2014. Disponível em: <
<https://goldbook.iupac.org/html/B/B00663.html>> Acesso em: 01 dezembro 2018.

KAUSHIK, N.; BISWAS, S.; SINGH, J. **Biocatalysis and biotransformation processes – an insight**. The SciTech Journal, v.1, 2014.

KAVITA, V. **DNA Biosensors – a review**. Journal of Bioengineering & Biomedical Science, v.7, 2017.

KRACHER, D.; LUDWIG, R. **Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature – A review**. Journal of Land Management, Food and Environment, v.67, p.145-163, 2016.

KRAINER, F.W.; CAPONE, S.; JÄGER, M.; VOGL, T.; GERSTMAN, M.; GLIEDER, A.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. **Optimizing cofactor availability for the production of recombinant heme peroxidase in *Pichia pastoris***. Microbial Cell Factories, v.14, 2015.

LI, D.; ZHANG, B.; LI, S.; ZHOU, J.; CAO, H.; HUANG, Y.; CUL, Z. **A novel vector for construction of markerless multicopy overexpression transformants in *Pichia pastoris***. Frontiers in Microbiology, v.8, 2017.

LUDWIG, R.; HALTRICH, D. **Cellobiose dehydrogenase production by *Sclerotium* species pathogenic to plants**. Letter in Applied Microbiology, v.35, p.261-266, 2002.

LUDWIG, R.; HARREITHER, W.; TASCA, F.; GORTON, L. **Cellobiose dehydrogenase: a versatile catalyst for electrochemical applications**. Chemphyschem, v.10, p.2674-2697, 2010.

LUDWIG, R.; ORTIZ, R.; SCHULZ, C.; HARREITHER, W.; SYGMUND, C.; GORTON, L. **Cellobiose dehydrogenase modified electrodes: advances by materials science and biochemical engineering**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.405, p.3637-3658, 2013.

LUDWIG, R.; HALTRICH, D.; HARREITHER, W.; GORTON, L. **Cellobiose dehydrogenase**. US 9.873.864 B2, 31 de agosto de 2017, 23 de janeiro de 2018.

MA, S.; PREIMS, M.; PIUMI, F.; KAPPEL, L.; SEIBOTH, B.; RECORD, E.; KRACHER, D.; LUDWIG, R. **Molecular and catalytic properties of fungal extracellular cellobiose dehydrogenase produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems**. Microbial Cell Factories, v.16, 2017.

MARTINEZ, A.T.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; CAMARERO, S.; SERRANO, A.; LINDE, D.; LUND, H.; VIND, J.; TOWBORG, M.; HEROLD-MAJUMDAR, O.M.; HOFRICHTER, M.; LIERS, C.; ULLRICH, R.; SCHEIBNER, K.; SANNIA, G.; PISCITELLI, A.; PEZZELLA, C.; SENER, M.E.; KILIÇ, S.; BERKEL, W.J.H.; GUALLAR, V.; LUCAS, M.F.; ZUHSE, R.; LUDWIG, R.; HOLLMANN, F.; FERNANDEZ-FUEYO, E.; RECORD, E.; FAULDS, C.B.; TORTAJADA, M.; WINCKELMANN, I.; RASMUSSEN, J.; PUJIC, M.G.; GUTIERREZ, A.; RIO, J.C.; RENCORET, J.; ALCALDE, M. **Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations**. Biotechnology advances, v.35, p.815-831, 2017.

MARTINS, T.D.; RIBEIRO, A.C.C.; CAMARGO, H.S.; FILHO, P.A.C.; CAVALCANTE, H.P.M.; DIAS, D.L. **New insights on optical biosensors: Techniques, construction and application**. State of the Art in Biosensors - General Aspects, 2013.

MCDONALD, A.G.; TIPTON, K.F. **Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties**. The FEBS Journal, v.281, p.583-592, 2014.

MEHROTRA, P. **Biosensors and their applications – a review**. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, 2016.

NYANHONGO, G.S.; THALLINGER, B.; GUEBITZ, G.M. **Cellobiose dehydrogenase-based biomedical applications**. Process Biochemistry, v.59, p.37-45, 2017.

PAZMIÑO, D.E.T.; WINKLER, M.; GLIEDER, A.; FRAAIJE, M.W. **Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications.** Journal of Biotechnology, v.146, p.9-24, 2010.

PLANTZ, B.A.; SINHA, J.; VILLARETE, L.; NICKERSON, K.; SCHLEGEL, V. ***Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.72, p.297-305, 2006.

PORTER, J.L.; RUSLI, R.A.; OLLIS, D.L. **Directed evolution of enzymes for industrial biocatalyses.** Chemiochem, v.17, p.197-203, 2016.

ROBINSON, P.K. **Enzymes: principles and biotechnological applications.** Essays Biochemistry, v.59, p.1-41, 2015.

SCHULZ, C. **Cellobiose dehydrogenase on electrodes – an electrochemical biosensor for various analytes tunable by positive charges.** Lunds Universitet, 2015.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. **Microbial enzymes: industrial progress in 21st century.** 3 Biotech, v.6, 2016.

TAN, T.C.; KRACHER, D.; GANDINI, R.; SYGMUND, C.; KITTL, R.; HALTRICH, D.; HÄLLBERG, B.M.; LUDWIG, R.; DIVNE, C. **Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation.** Nature communications, 2015.

TASCA, F.; GORTON, L.; HARREITHER, W.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; NÖLL, G. **Direct electron transfer at cellobiose dehydrogenase modified anodes for biofuel cells.** The Journal of Physical Chemistry, v.112, p.9956-9961, 2008.

TAVAHODI, M.; SCHULZ, C.; ASSARSSON, A.; ORTIZ, R.; LUDWIG, R.; LAGO, C.C.; HAGHIGHI, B.; GORTON, L. **Interaction of polymer-coated gold nanoparticles with cellobiose dehydrogenase: The role of surface charges.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v.819, p.226-233, 2018.

WALSKI, T.; DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. **Diversity and functions of protein glycosylation in insects.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2017.

XU, F. **Applications of oxidoreductases: Recent progress.** Industrial Biotechnology, v.1, 2005.

YANG, Z.; ZHANG, Z. **Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review.** Biotechnology Advances, v.36, p.182-195, 2018.

YOSHIDA, M.; OHIRA, T.; IGARASHI, K.; NAGASAWA, H.; AIDA, K.; HALLBERG, M.; DIVNE, C.; NISHINO, T.; SAMEJIMA, M. **Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.65, p.2050-2057, 2001.

ZAMOCKY, M.; LUDWIG, R.; PETERBAUER, C.; HALLBERG, B.M.; DIVNE, C.; NICHOLLS, P.; HALTRICH, D. **Cellobiose dehydrogenase – A flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi.** Current protein and peptide science, v.7, p.255-280, 2006.

ZHANG, R.; FAN, Z.; KASUGA, T. **Expression of cellobiose dehydrogenase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization.** Protein Expression and Purification, v.75, p.63-69, 2011.

ZHAO, W.W.; XU, J.J.; CHEN, H.Y. **Photoelectrochemical enzymatic biosensors.** Biosensors and Bioelectronics, v.92, p.294-304, 2017.

ZHENG, J.; GUO, N.; ZHOU, H.B. **A simple strategy for the generation of multi-copy *Pichia pastoris* with the efficient expression of mannanase.** Journal of Basic Microbiology, v.54, p.1410-1416, 2014.