



## Construção de uma linhagem de levedura modelo para triagem de inibidores da Oxidase Alternativa de *Moniliophthora perniciosa*

Palavras-Chave: [VASSOURA-DE-BRUXA], [*Pichia pastoris*], [*Moniliophthora perniciosa*]

Autores/as:

Lethicia Camboin de Oliveira [UNICAMP]

Gustavo Seguchi [UNICAMP]

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador) [UNICAMP]

Dr. Felipe da Silveira Bezerra de Mello (Coorientador) [UNICAMP]

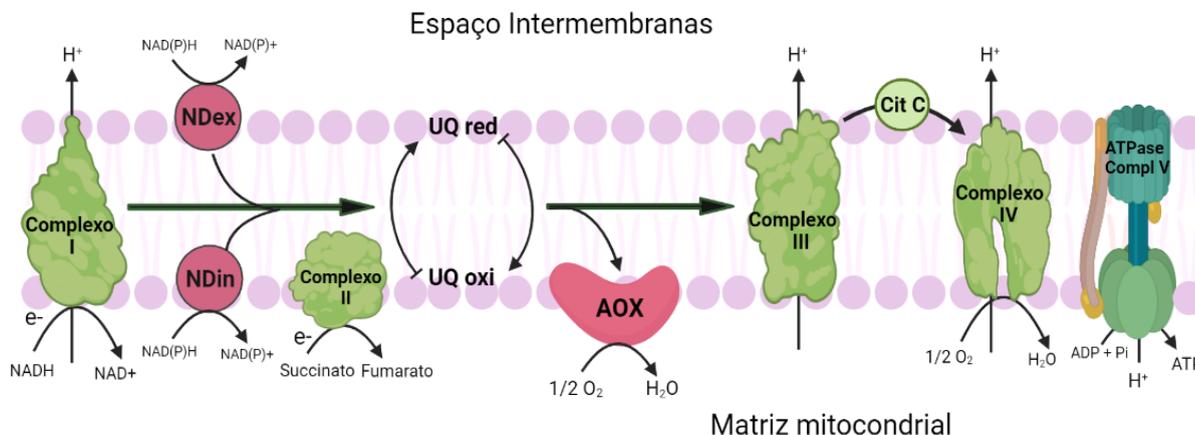
### INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao*) é uma planta endêmica da região amazônica, cujos frutos dão origem a amêndoas de valor comercial por servirem de matéria-prima para produtos na área da indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (PIRES, Bárbara 2020). No Brasil, na década de 80, o país alcançou a sua produtividade máxima, tornando-se assim o 2º maior produtor do mundo (FAOSTAT). Porém, em 1989, foi detectado na Bahia o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da Vassoura-de-Bruxa (VDB), reduzindo drasticamente a produção de cacau.

O fungo *M. perniciosa* é do tipo basidiomiceto e hemibiotrófico, ou seja, tem duas fases de crescimento distintas, a biotrófica e a necrotrófica (**Figura 1**) (FORMIGHIERI, Eduardo 2006). Na fase biotrófica, os basidiósporos penetram na planta através dos estômatos e tecidos lesados, infectando os tecidos meristemáticos, colonizando a planta e retirando seus nutrientes. Durante essa fase, o fungo cresce intercelularmente na planta, causando sintomas como a hiperplasia e hipertrofia dos tecidos afetados e formação de hastes anormais - resultando em estruturas chamadas 'vassoura verde' (ALMEIDA, Gabriel Moretti 2014). Já na fase necrotrófica o fungo passa a crescer dentro das células da planta, causando necrose e morte dos tecidos infectados. Neste cenário, as 'vassouras verdes' dão lugar a estruturas chamadas de 'vassouras secas'.

Durante a infecção dos cacauieiros, a planta passa a produzir uma grande quantidade de óxido nítrico (NO), inibindo o complexo IV da cadeia respiratória do fungo, atuando como mecanismo de defesa vegetal. É neste estágio que os níveis de expressão da enzima oxidase alternativa (AOX) de *M. perniciosa* (MpAOX) são mais elevados (PIRES, Bárbara 2020). A AOX é uma proteína monotópica localizada na região matricial da membrana mitocondrial interna. Em *M. perniciosa*, a AOX atua na criação de uma via alternativa para o fluxo de elétrons na cadeia respiratória (**Figura 2**). Da mesma forma que o NO produzido pela planta, principais agrotóxicos fúngicos também costumam inibir a cadeia respiratória principal do fitopatógeno - desestabilizando a produção de ATP e aumentando a produção de espécies

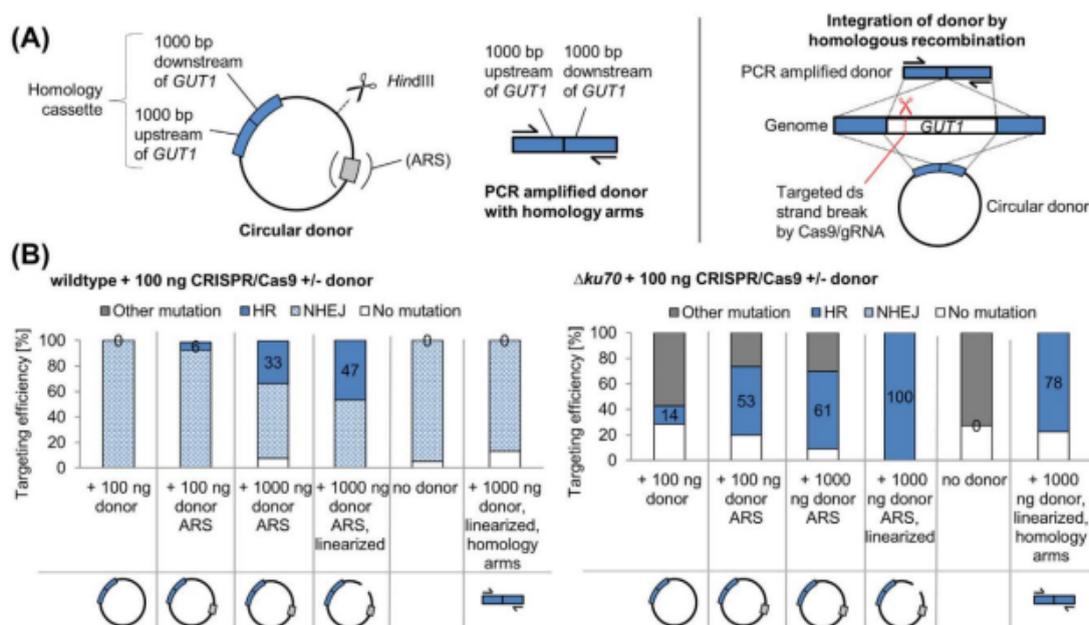
reativas de oxigênio (EROs) (ALMEIDA, Gabriel Moretti 2014). Porém, com a atuação da AOX, *M. pernicioso* consegue continuar produzindo uma quantidade de ATP suficiente através da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, além de não permitir o acúmulo de elétrons que contribuem para formação de EROs, extremamente tóxicas. Este mecanismo permite, portanto, que não haja uma parada completa do metabolismo mitocondrial e a célula não morra, mantendo o ciclo infeccioso da VDB.



**Figura 2** Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, incluindo as vias principal (em verde) e alternativa (em rosa).

Sendo assim, a MpAOX torna-se um fator crucial para a sobrevivência e virulência do fitopatógeno, configurando-se como o alvo ideal para o desenvolvimento de drogas para o controle da doença. Entretanto, o cultivo e manipulação de *M. pernicioso* para triagem de moléculas inibidoras de MpAOX se mostra como uma atividade laboriosa, dada à complexidade do ciclo de vida do fitopatógeno. Desta forma, uma alternativa viável para este fim é utilizar a levedura *Pichia pastoris*, que expressa uma AOX endógena (PpAOX) e é um microrganismo de fácil manuseio. *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica amplamente utilizada para produção de proteínas heterólogas, por ser um hospedeiro com sistema de expressão eucariótico e alta taxa de replicação.

Um desafio na manipulação genética de *P. pastoris* é que sua maquinaria de reparo de DNA por recombinação homóloga (HR) é pouco eficaz, tornando assim, mais dificultosa a inserção de sequências de DNA heterólogas. Uma maneira de melhorar a eficiência de direcionamento dos genes em *P. pastoris* para recombinação homóloga é realizar o *knockout* do gene *KU70*, uma proteína de ligação terminal de DNA que participa do processo de reparo por união de extremidade não-homóloga (NHEJ). Com a taxa de reparo de DNA por HR intensificada, espera-se maior facilidade para integração de genes heterólogos em *P. pastoris*, como o gene MpAOX (**Figura 3**).



**Figura 3** ARSs promovem integração eficiente mediada por CRISPR/Cas9 de fragmentos doadores sem marcadores na cepa de tipo selvagem de *P. pastoris*. A- Desenho dos cassetes doadores (lado esquerdo) e eventos de recombinação direcionados (lado direito). B- *P. pastoris* tipo selvagem (lado esquerdo) e  $\Delta ku70$  (lado direito) co-transformação com 100 ng de DNA de plasmídeo CRISPR-Cas9 (*GUT1-gRNA2*) e vários fragmentos doadores. (Fonte: *J of cellular Biochemistry*, Volume: 119, Issue: 4, Pages: 3183-3198, First published: 01 November 2017, DOI: (10.1002/jcb.26474)).

Para a edição genômica de *P. pastoris*, a ferramenta CRISPR-Cas9 tem se mostrado como alternativa eficiente (WENINGER, Astrid et al. 2018). CRISPR-Cas9 é um sistema de edição genômica, que faz uso de uma sequência curta de RNA para guiar a endonuclease Cas9 a fim de clivar uma sequência específica de DNA. Neste projeto, a deleção dos genes *KU70* e *PpAOX* será realizada através do sistema CRISPR-Cas9 e a inserção do gene codificante da proteína *MpAOX* no local de deleção de *PpAOX* será realizada pelo reparo de DNA por HR.

## METODOLOGIA:

Étapas	Atividades
Montagem de um vetor modular CRISPR-Cas9 para edição de <i>P. pastoris</i>	Construção do vetor pLC_004, contendo as estruturas específicas para edição CRISPR-Cas9 em <i>P. pastoris</i> .
	Confirmação da montagem do plasmídeo pLC_004 (TEF1-Cas9-CYC1 SNR52-gRNA-SUP4)
Desenvolvimento de uma linhagem <i>P. pastoris</i> com maior taxa de HR através da $\Delta KU70$	Montagem do plasmídeo pLC_004.01 para inserção de um gRNA homólogo à sequência de <i>KU70</i>
	Transformação de <i>P. pastoris</i> com plasmídeo pLC_004.01
	Confirmação de uma linhagem <i>P. pastoris</i> <i>KU70</i> (LCY001)
Substituição da AOX endógena de <i>P. pastoris</i> por uma <i>MpAOX</i>	Linearização e purificação do plasmídeo de expressão de <i>MpAOX</i> (pUC57_MpAOX) contendo 400 bp de homologia upstream e downstream à <i>PpAOX</i>
	Montagem do plasmídeo pLC_004.02 para inserção de um gRNA homólogo à sequência de <i>PpAOX</i>
	Transformação de LCY001 usando plasmídeo pLC_004.02 e pUC57_MpAOX linearizado

	Confirmação da linhagem <i>P. pastoris</i> KU70 MpAOX (LCY002)
<b>Caracterização da linhagem modificada a inibidores de AOX</b>	Fenotipagem da linhagem LCY002 sob diferentes inibidores de AOX

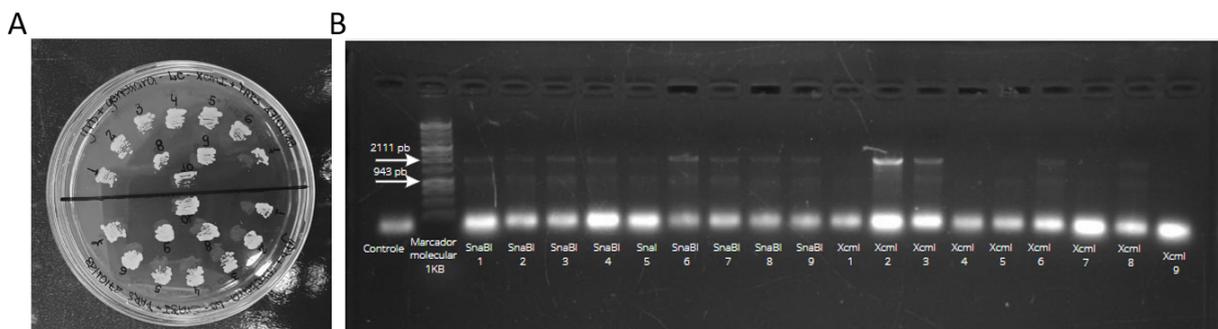
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Devido às dificuldades encontradas ao realizar as primeiras atividades propostas inicialmente, as etapas incipientes do projeto foram alteradas e encontram-se em andamento.

A alteração das atividades iniciais do projeto ocorreram após observarmos, através da realização de PCRs, que o vetor pPBLp\_004 (FAPESP 2016/24264-5 e 2018/03130-6), disponível na biblioteca de plasmídeos do laboratório, e que seria utilizado inicialmente como base para a construção de um vetor modular CRISPR-Cas9 possuindo uma sequência de gRNA para edição de PpAOX para edição de *P. pastoris*, não continha o número de pares de base adequado, apontando assim um possível erro na sequência desejada do plasmídeo. Portanto, para prosseguimento do projeto, uma nova atividade foi adicionada ao cronograma: a construção de um novo plasmídeo a partir do vetor pGS\_004.0, contendo as estruturas específicas para edição CRISPR-Cas9, em *S. cerevisiae*, a partir do qual será integrado a origem de replicação para *P. pastoris* (pARS1). Para isso, tentamos utilizar duas enzimas de restrição diferentes, XcmI e SnaBI, para que posteriormente ocorresse a substituição de 2 $\mu$  por pARS1 (amplificação da PARS1 foi realizada a partir do vetor pUO-pp-323-7-PARS (**Figura 4**) obtido a partir do banco de plasmídeos Open Yeast Collection), através de clonagem in vivo em *S. cerevisiae*. Após transformação em levedura (BY4742) foram realizadas a extração de DNA e confirmação da montagem do plasmídeo através de PCR de colônia (usando os primers LCO\_011 e 012) e eletroforese (**Figura 5**).



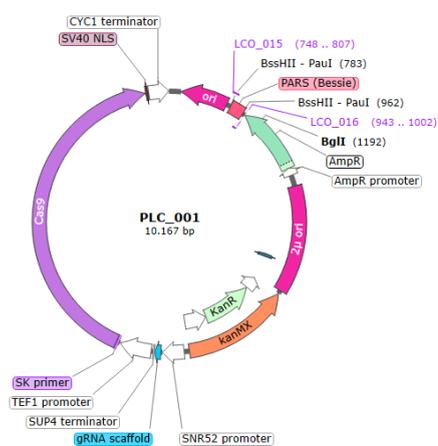
**Fig 4.** A) Mapa do vetor pUO-pp-323-7-PARS com destaque para os primers LCO\_013 e 014 utilizados para amplificação de pARS1. B) Gel de eletroforese do resultado da reação de PCR usando enzima GoTaq, e Phusion (C).



**Fig 5.** A) Back-up das colônias transformadas em YPD+geneticina; B) 18 reações de PCR (1 para cada backup, resultando em um total de 9 reações para cada enzima de restrição, XcmI e SnaBI) (gotaq), à 53°C, para confirmação da substituição da origem de replicação de *S. cerevisiae* (2μ) pela origem de replicação de *P. pastoris* (pARS1).

Os diferentes tamanhos das bandas observados nas figuras são equivalentes à presença de 2μ e pARS1, respectivamente, indicando que as células de levedura transformadas possuem não apenas o vetor final (contendo pARS1), mas também o vetor original - possivelmente resquícios da digestão ineficiente do pGS\_004.0. Desta forma, isolamos o vetor de interesse (pGS\_004.0 contendo pARS1 em substituição à 2μ), para amplificação em *E. coli*, porém não obtivemos êxito nesta última etapa, pois as células eletroporadas não cresceram como esperado.

Tendo em vista que os métodos antes utilizados não obtiveram o resultado previsto, tentamos integrar a PARS1 ao vetor PGS004.0 através de digestão com a enzima de restrição BssHII (Fig 6) e posteriormente clonagem in vivo em *S. cerevisiae*. Porém essas tentativas também foram falhas.



**Fig 6.** A) vetor com sítio de restrição para BssHII.

Atualmente estamos tentando integrar a PARS1 ao vetor PGS004.0 através da digestão com BglI e clonagem in vivo em *S. cerevisiae* e esperamos que a partir dessa nova estratégia nosso novo vetor possa ser logrado. Sendo assim, a partir dele o gene KU70, responsável pela alta taxa de reparo de DNA por recombinação não homóloga, será deletado em *P. pastoris* e a posteriori será deletado o gene PpAOX também através do sistema CRISPR-Cas9 a fim de inserir o gene MpAOX.

## CONCLUSÕES:

Até o presente momento, a montagem de um vetor para edição CRISPR-Cas9 de *Pichia pastoris* se demonstrou desafiadora, dado que o vetor original pPBLp\_004 a partir do qual seria feita esta atividade não apresentou a estrutura esperada. Apesar das dificuldades, já foram estabelecidas novas atividades para superação deste desafio. Desta forma, espera-se construir um sistema efetivo para edição genômica de *P. pastoris*.

## BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, Gabriel Moretti de. **Estudo da função biológica da oxidase alternativa (AOX) de Moniliophthora perniciosa (fungo da vassoura de bruxa) em Saccharomyces cerevisiae.** 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. DOI: 10.11606/D.9.2014 tde-27052015-144918

JINEK, Martin *et al.* **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** Science (New York, N.Y.) vol. 337,6096 (2012): 816-21. doi:10.1126/science.1225829

KARBALAEI, Mohsen; REZAEI, Seyed A; FARSIANI, Hadi. **Pichia pastoris: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins.** J Cell Physiol, set. 2020. Vol. 235(9):5867-5881, p. 1-15. DOI: 10.1002/jcp.29583. PMID: 32057111; PMCID: PMC7228273.

NÄÄTSAARI, Laura; MISTLBERGER, Beate; RUTH, Claudia; HAJEK, Tanja; HARTNER, Franz S; GLIEDER, Anton. **Deletion of the Pichia pastoris KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology.** PLoS ONE, 2012. Vol. 7(6):e39720. DOI: 10.1371/journal.pone.0039720. Epub 29 de jun. 2012. PMID: 22768112; PMCID: PMC3387205.

PIRES, Bárbara Aliende. **Integração de ômicas para a investigação de mecanismos de resistência de Moniliophthora perniciosa, a um fungicida inibidor da enzima Oxidase Alternativa.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2020.

WENINGER, Astrid *et al.* **Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for Pichia pastoris with efficient donor integration and alternative resistance markers.** Journal of cellular biochemistry, 2018. Vol. 119,4 (2018): 3183-3198. DOI:10.1002/jcb.26474. PMID: 29091307; PMCID: PMC5887973.