



OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM *S. CEREVISIAE* A PARTIR DA REGULAÇÃO MODERADA DE GENES DO METABOLISMO DA GLICOSE USANDO O SISTEMA CRISPR-DCAS9

Palavras-Chave: “CRISPR-dCas9”, “levedura”, “regulação gênica”, “*Saccharomyces cerevisiae*”

Autores:

JOÃO MIGUEL SPAVERI (INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP)
DR. FELLIPE DA SILVEIRA BEZERRA DE MELLO (INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP)
PROF. DR. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA (INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

Frente às consequências ambientais causadas pelo uso de combustíveis fósseis, o estudo e o aprimoramento dos processos industriais para produção de biocombustíveis são de extrema importância para a sociedade contemporânea. Nesse contexto, o bioetanol apresenta-se como uma alternativa bastante robusta de produção de bioenergia em escala industrial e mostra-se especialmente vantajoso por dispor de um setor de produção muito bem desenvolvido e consolidado no Brasil (BASSO et al., 2008).

Na geração do bioetanol, o processo fermentativo destaca-se como processo chave para obtenção do produto final. Em escala industrial, esse processo é realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cujo metabolismo converte os componentes da biomassa, como a glicose, em combustível disponível ao uso humano. O amplo uso de *S. cerevisiae* em biorrefinarias, especificamente, se deve a suas elevadas taxas de produção e a alta resistência ao estresse osmótico e ao próprio etanol produzido. Tendo em mente a importância desse organismo para a indústria sucroalcooleira, uma das maneiras de aprimorar a produção do bioetanol é o melhoramento das suas vias metabólicas de fermentação (HONG e NIELSEN, 2012).

No entanto, a fermentação não é a única rota possível para as hexoses absorvidas pela levedura, visto que o carbono é utilizado para sintetizar outros metabólitos importantes para a célula. O glicerol, por exemplo, é o terceiro subproduto mais sintetizado no processo de fermentação e sua via de produção também consome açúcar, como a via do etanol (GOMBERT e VAN MARIS, 2015). Portanto, há uma fuga de carbono disponível para a produção de etanol em razão da síntese de glicerol cujo efeito poderia ser atenuado caso essa via metabólica fosse manipulada. Com isso em mente, diversos estudos realizaram silenciamento de genes ligados à biossíntese de glicerol, em especial os genes *GPD1* e *GPD2* que codificam duas isoformas da enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase, a fim de analisar o impacto dessa modalidade de edição binária sobre a produtividade de etanol (NAGHSHBANDI et al., 2019).

A enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase atua no início da via de biossíntese de glicerol, na conversão de dihidroxiacetona fosfato em glicerol 3-fosfato, e sua expressão é afetada por condições celulares internas e externas, como estresse osmótico e desbalanço de cofatores. Mais especificamente, os genes *GPD1* e *GPD2* são expressos em resposta a estresse osmótico e no equilíbrio de cofatores (NADH e NAD⁺), respectivamente (SCANES et al., 1998; ANSELL et al., 1997). Em razão dessas importantes funções fisiológicas da produção de glicerol, o silenciamento de *GPD1* e de *GPD2* simultaneamente gerou mutantes incapazes de crescer em condições anaeróbicas (BJÖRKQVIST et al., 1997). Por sua vez, o silenciamento apenas do gene *GPD1* levou a diferentes resultados de acordo com o meio de cultura: em meios com alta concentração de glicose, houve redução da síntese de glicerol em 50% e aumento da produção de etanol em 5,1% e, em meios com baixa concentração, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente relevante entre o mutante e o tipo selvagem (MICHNICK et al., 1997; VALADI et al., 1998). Em relação ao gene *GPD2*, seu silenciamento resultou em uma diminuição de 40% na síntese de glicerol e aumento de 13% da produção de etanol. No entanto, o mutante com *GPD2* silenciado apresentou declínio de 50% no crescimento (VALADI et al., 1998).

Com esses estudos, é possível entender o conflito entre o aumento da produção de etanol por meio da deleção dos genes *GPD1* e *GPD2* e o crescimento anaeróbico da levedura. Portanto, como forma de evitar os efeitos negativos do silenciamento, as abordagens de regulação moderada aparecem como boas alternativas. Uma das ferramentas utilizadas para atingir níveis de regulação mais ajustáveis é o sistema CRISPR-dCas9 (BOWMAN et al., 2020). Trata-se de um sistema idêntico ao CRISPR-Cas9, mas que utiliza a endonuclease dCas9 com o sítio de clivagem de DNA mutado e inativo (dCas9). Nesse caso, a enzima continua a ser guiada pelo sgRNA e consegue reconhecer e se ligar à região de interesse do DNA, mas não realiza a quebra da dupla fita (QI et al., 2013).

Com esse mecanismo em mãos, é possível utilizar a dCas9 fusionada a proteínas de repressão da transcrição e posicioná-las no promotor de genes de interesse, como os genes *GPD1* e *GPD2*, que participam na produção de glicerol, cuja expressão pode ser reduzida com o objetivo de aprimorar a produção de etanol.

METODOLOGIA:

A linhagem de *S. cerevisiae* laboratorial BY4742 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*) (BRACHMANN et al., 1998) foi utilizada nos experimentos de modulação da expressão de genes alvos da via de biossíntese de glicerol para otimização da produção de etanol. As cepas foram cultivadas em YPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona e 20 g.L⁻¹ glicose) para fins de inóculo e propagação. YPD suplementado com 200 μ g.mL⁻¹ de geneticina (G418) ou 300 μ g.mL⁻¹ de higromicina foram usados para seleção de células transformadas com marcador *KanMX* e *hphMX6*, respectivamente. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e 250 rpm, quando necessário agitação.

Escherichia coli DH5 α foram utilizadas para propagação e manutenção de vetores de expressão de levedura. Células DH5 α foram cultivadas em meio Luria Bertani (10 g.L⁻¹ triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio) adicionadas de 100 mg.mL⁻¹ de ampicilina para amplificação de plasmídeos. O cultivo foi feito a 37 °C e 250 rpm, quando necessário agitação.

Em todos os casos, 15 g.L⁻¹ de ágar foi adicionado ao meio para cultivo em meio sólido e glicerol 50% foi adicionado 1:1 para armazenamento estoque a -80 °C.

A transformação de levedura foi realizada através do método PEG/LiAc, descrito por Gietz e Schietls (2007). Transformação de células de *E. Coli* DH5 α foi realizada pelo protocolo padrão de choque elétrico. Purificação de plasmídeos de bactéria foi feito com um protocolo caseiro de miniprep. DNA genômico foi extraído usando um protocolo rápido (LiOAc)-SDS/EtOH (LÖÖKE et al., 2017) para uso em reação em cadeia da polimerase (PCR), ou pelo método Fenol/Clorofórmio para ensaios de sequenciamento. Todas as reações de PCR foram realizadas usando a polimerase de alta fidelidade Phusion® de acordo com as instruções do fabricante (NEB).

O plasmídeo usado neste estudo foi desenvolvido por (CÁMARA et al., 2020) e contém o cassete de expressão da proteína dCas9 fusionada ao efetor Mxi1 e marcador de seleção em geneticina. Para clonagem de sgRNAs específicos nos plasmídeos dCas9, sequências alvo ótimas para cada gene foram obtidas pelas ferramentas Yeast CRISPRi e CRISPR-ERA (SMITH et al., 2016). Os vetores com os sgRNAs específicos foram construídos a partir da linearização dos plasmídeos dCas9-Mxi1 com a enzima de restrição Bpil e, posteriormente, clonados a insertos de 100 bp contendo o sgRNA em questão e sequências de 40 bp de homologia às extremidades do plasmídeo linearizado. Os insertos de 100 bp foram construídos por hibridização (aquecimento e resfriamento) usando dois oligos complementares.

A confirmação das clonagens foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1,5%) após amplificação por PCR utilizando um par de primers interno à sequência de sgRNA inserida e externo à sequência para cada um dos sgRNAs.

A linhagem BY4742 transformada com os plasmídeos dCas9-Mxi1 clonado com as sequências específicas de sgRNA foram cultivadas em YPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona e 50 g.L⁻¹ glicose) suplementado com geneticina (G418). O cultivo ocorreu em triplicata a uma densidade óptica celular inicial igual a 1, 30 °C e 200 rpm em 10 mL de meio condicionado em tubos de 50 mL. A amostra final foi coletada após 12 horas de fermentação para análise de composição e biomassa. A concentração dos analitos foi quantificada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em relação à escolha das sequências de sgRNAs específicas para cada um dos sítios dos genes GPD, foram escolhidas quatro sequências entre -500 e -100 pares de base em relação ao TSS em intervalos de 100pb (**Figura 1**), de forma a aprofundar o entendimento dos diferentes efeitos do uso de diferentes sítios para a regulação. A escolha das novas sequências seguiu os índices de ocupação de nucleossomo e acessibilidade da cromatina disponíveis na plataforma CRISPRi desenvolvidos por (SMITH et al., 2016) e os índices de off-target disponibilizados pela plataforma CRISPR-ERA, os quais provaram-se bons índices para medir a eficiência de repressão pelo sistema CRISPR-dCas9 em leveduras (CÁMARA et al., 2020).

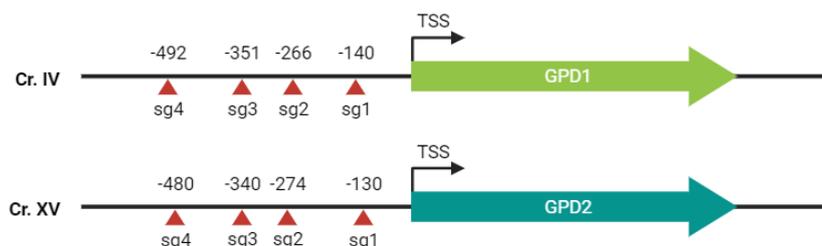


Figura 1. Esquema da localização das novas sequências escolhidas como alvo para o sgRNA na região promotora dos genes *GPD1* e *GPD2*.

A clonagem dos vetores dCas9-Mxi1 foi realizada a partir da transformação de *S. cerevisiae* (BY4742) utilizando o plasmídeo digerido e os *dsOligos*. Os transformantes foram cultivados em placa YPD com geneticina (G418, 200 ng/mL) e foram escolhidas colônias para a confirmação por PCR. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%) e o tamanho das bandas correspondeu ao esperado para o par de primers utilizados em cada um dos plasmídeos (**Figura 2**).

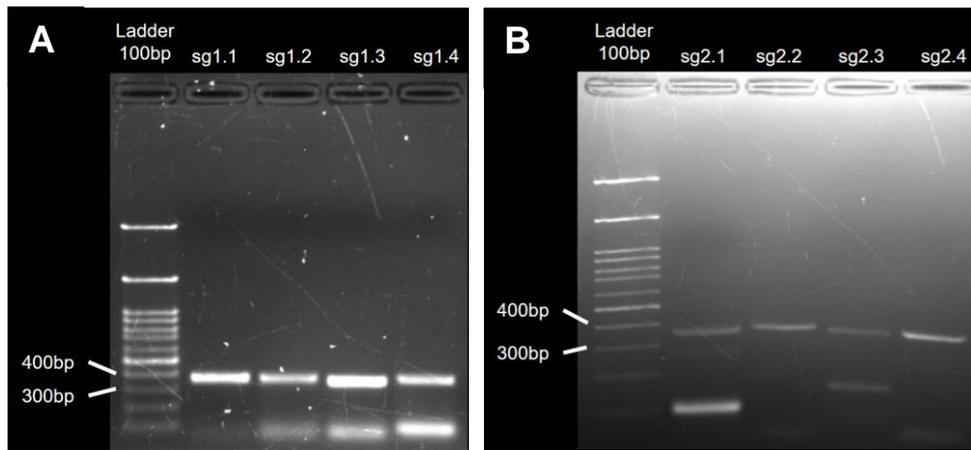


Figura 2A. Gel de eletroforese com o produto das reações de amplificação por PCR utilizando um par de primers interno e externo à sequência de sgRNA clonada ao plasmídeo de expressão da dCas9-Mxi1 para cada um dos sítios escolhidos pro gene GPD1. **B.** Gel de eletroforese com o produto de PCR utilizando um par de primers interno e externo à sequência de sgRNA clonada para cada um dos sítios escolhidos pro gene GPD2.

Após a confirmação da clonagem dos sgRNAs escolhidos, as cepas construídas foram submetidas à fermentação. Com esse objetivo, foram cultivados pré-inóculos de cada uma das cepas em Erlenmeyers de 125 mL por 48 horas a 250 rpm e 30 °C em 25 mL de YPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona e 20 g.L⁻¹ glicose) suplementado com geneticina (G418). A partir dos pré-inóculos, as cepas foram cultivadas com uma densidade ótica celular inicial igual a 1 por 12 horas em tubos de 50 mL a 200 rpm e 30 °C em 10 mL de YPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona e 50 g.L⁻¹ glicose) com geneticina (G418). Foram coletadas uma amostra após 12 horas para cada uma das linhagens (com exceção das cepas controle e com plasmídeo dCas9-Mxi1-sg1.2 em razão da baixa densidade ótica) e a concentração de glicerol foi submetido à análise em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (**Figura 3**). Como resultado, pode-se observar que as concentrações de glicerol são diferentes para cada uma das linhagens, no entanto são necessárias análises estatísticas e metodológicas posteriores como confirmação.

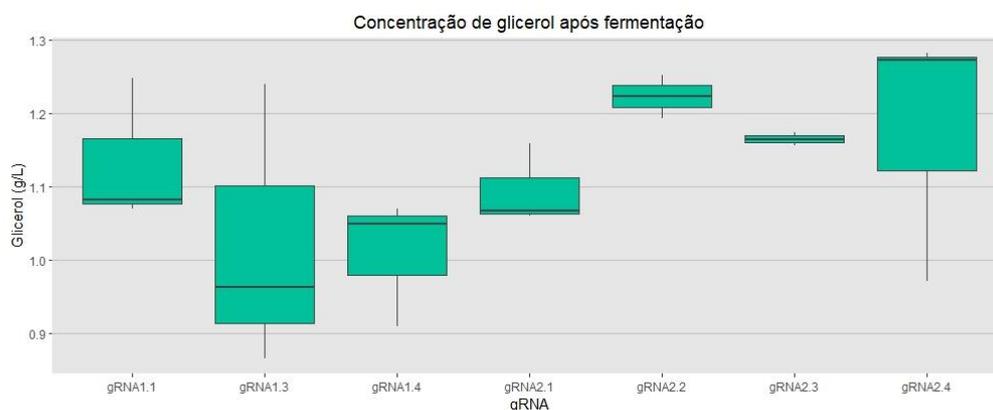


Figura 3. Gráfico *boxplot* da concentração de glicerol produzido pelas cepas construídas (com os plasmídeos dCas9-Mxi1 com os sgRNAs para cada sítio escolhido) após 12 horas de fermentação.

BIBLIOGRAFIA

ANSELL, R. *et al.* The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and Redox Regulation. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 9, p. 2179–2187, mai. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2179>.

BASSO, Luiz C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>.

- BJÖRKQVIST, S. *et al.* Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 128–132, jan. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.128-132.1997>.
- BLOMBERG, A; ADLER, L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 2, p. 1087–1092, fev. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.1087-1092.1989>.
- BOWMAN, Emily K *et al.* Bidirectional titration of yeast gene expression using a pooled CRISPR guide RNA approach. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 117, n. 31, p. 18424-18430, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2007413117>.
- BRACHMANN, Carrie B. *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces Cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 115–132, dez. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::aid-yea204>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(19980130)14:2<115::aid-yea204>3.0.co;2-2).
- CÁMARA, E. *et al.* A CRISPR activation and interference toolkit for industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain KE6-12. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71648-w>.
- GIETZ, R. Daniel; SCHIESTL, Robert H. High-efficiency yeast transformation using the LIAC/SS carrier DNA/peg method. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 31–34, jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>.
- GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 81–86, jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.012>.
- HONG, Kuk-Ki; NIELSEN, Jens. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 16, p. 2671-2690, mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0945-1>.
- LÖÖKE, Marko; KRISTJUHAN, Kersti; KRISTJUHAN, Arnold. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. **BioTechniques**, v. 62, n. 1, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/000114497>.
- MICHNICK, S. *et al.* Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **Yeast**, v. 13, n. 9, p. 783–793, jul. 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199707\)13:9<783::aid-yea128>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199707)13:9<783::aid-yea128>3.0.co;2-w).
- NAGHSHBANDI, Mohammad P. *et al.* Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 115, n. 109353, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109353>.
- QI, Lei S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1173-1183, fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>.
- SCANES, K. T. *et al.* Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A Review. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 19, n. 1, fev. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.21548/19-1-2239>.
- SMITH, J. D. *et al.* Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p.1, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0900-9>.
- VALADI, H. *et al.* Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 434–439, out. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002530051317>.