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 SPAVIERI (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 por microrganismos cujos metabolismos convertem os componentes da biomassa, como a glicose, a sacarose e outros açúcares presentes, em combustível disponível ao uso humano (HONG e NIELSEN, 2012). O amplo uso de *Saccharomyces 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 (KIM et al., 2013; JEFFRIES e JIN, 2004).

Felizmente, essa levedura é extensamente utilizada em pesquisas científicas e apresenta informação abundante sobre seu genoma, sua fisiologia e seu manuseio em contexto industrial e científico, inclusive como plataforma para estudo de ferramentas de engenharia genética (RANTASALO et al., 2018; LEE et al., 2015). Dentre as ferramentas testadas e utilizadas em *S. cerevisiae*, destaca-se o sistema CRISPR-Cas9 (AKHMETOV et al., 2018). Essa ferramenta de edição genômica tem origem em mecanismos de resposta imune de bactérias contra fagos e consiste basicamente em uma endonuclease (Cas9) associada a um RNA guia (sgRNA) cuja função é direcionar a enzima a uma sequência específica de DNA que se deseja editar. Em razão de sua simplicidade e versatilidade, esse sistema tem sido extensamente utilizado para a inserção de material genético heterólogo ou para a deleção de parte do DNA endógeno (ADLI, 2018).

Tendo em vista o aprimoramento da produção de bioetanol, diversas pesquisas realizaram silenciamento ou superexpressão de genes utilizando o sistema CRISPR-Cas9, assim como expressão heteróloga de certas proteínas em levedura. Por outro lado, visando aumentar a flexibilidade e o controle de expressão, pode-se explorar uma ferramenta baseada no sistema CRISPR-Cas9 chamada 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.

DISCUSSÃO

Como a fermentação não é a única rota possível para as hexoses absorvidas pela levedura, a ideia do projeto é regular a síntese de glicerol, uma vez que essa via metabólica utiliza açúcares que poderiam ser utilizados na fermentação para produção de etanol. O início da biossíntese de glicerol em *S. cerevisiae* é a fosforilação da glicose para, posteriormente, transformá-la em diidroxiacetona fosfato (DHAP). Em seguida, a DHAP é convertida em glicerol 3-fosfato através da ação de duas isoformas da enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPDH) codificadas pelos genes GPD1 e GPD2. Ao fim desse processo, que utiliza o cofator NADH e libera NAD+, obtém-se o glicerol que será utilizado na célula para diversas funções (NAGHSHBANDI et al., 2019).

A via de síntese de glicerol em *S. cerevisiae* atua, por exemplo, como resposta para evitar o estresse osmótico da célula. Para isso ocorrer, a levedura deve estar imersa em um meio hipertônico em relação ao interior da célula, pois, nesse contexto, há passagem de água do citosol para o meio externo em razão da diferença de pressão osmótica (BLOMBERG e ADLER, 1989). Para evitar que isso ocorra, a levedura passa a expressar principalmente o gene GPD1. Como consequência, há aumento na concentração de glicerol dentro da célula e a diferença entre a concentração de solutos no meio externo e interno é diminuída (SCANES et al., 1998).

Além disso, a síntese de glicerol também atua no equilíbrio da quantidade de cofatores na célula, pois, apesar da quantidade de NADH e NAD+ utilizadas serem balanceadas na via do etanol, outras reações importantes para o crescimento anaeróbio da levedura utilizam mais NAD+ do que NADH (BAKKER et al., 2001). Sendo assim, a célula passa a acumular NADH e a alta capacidade redutora dessa molécula leva a diversos problemas no funcionamento celular. Para evitar isso, a levedura expressa GPD2, responsável pela transformação da diidroxiacetona fosfato (DHAP) em glicerol 3-fosfato, pois esse processo utiliza NADH, diminuindo a sua concentração na célula e recuperando o cofator NAD+ (ANSELL et al., 1997).

No entanto, apesar das importantes funções da via do glicerol nos casos de estresse osmótico e desbalanceamento dos cofatores, essa molécula 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 dos genes GPD1 e GPD2 a fim de analisar o impacto dessa modalidade de edição binária sobre a produtividade de etanol (NAGHSHBANDI et al., 2019).

O silenciamento de GPD1 e de GPD2 simultaneamente gerou mutantes incapazes de crescer em condições anaeróbicas, provavelmente em razão do acúmulo de NADH na célula (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 e aumentar a flexibilidade de modificações na expressão dos genes GPD sem alterar a sequência de DNA, a abordagem de regulação moderada pelo sistema CRISPR-dCas9 mostra-se uma alternativa promissora para balancear o aumento da produção de etanol com crescimento adequado da levedura.

Neste projeto, O sistema será validado em linhagem laboratorial e, posteriormente, aplicado à levedura PE-2. A atual proposta lança mão de uma ferramenta da biologia sintética ainda não usada para este fim, como descrito na literatura, e soma a esforços tradicionais de deleção ou superexpressão dos mesmos genes, contribuindo para melhor compreensão deste fenômeno de elevado interesse comercial.

METODOLOGIA

A linhagem de *S. cerevisiae* laboratorial BY4742 (MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0) (BRACHMANN et al., 1998) e industrial PE-2 (MATa/MATα) (BASSO et al., 2008) serão utilizadas nos experimentos de modulação da expressão de genes alvos da via glicolítica para otimização da produção de etanol. As cepas serão 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. YNB (6.7 $g.L^{-1}$ base nitrogenada para levedura, 20 $g.L^{-1}$ glicose), CSM-L (500 $mg.L^{-1}$ *dropout* de aminoácidos sem L-Leucina), ou YPD suplementado com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de geneticina G418 serão usados para seleção de células transformadas com marcador *LEU2* ou *KanMX*, respectivamente. Todos os cultivos serão realizados a 30 ºC e 250 rpm, quando necessário agitação.

Escherichia coli DH5α será utilizada para propagação e manutenção de vetores de expressão de levedura. Células DH5α serão 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 será feito a 37 ºC e 250 rpm, quando necessário agitação.

Em todos os casos, 15 $g.L^{-1}$ de ágar será adicionado ao meio para cultivo em meio sólido e glicerol 50% será adicionado 1:1 para armazenamento estoque a -80 ºC.

A transformação de levedura será realizada através do método PEG/LiAc, descrito por Gietz e Schietls (2007). Transformação de células de *E. Coli* DH5α será realizada pelo protocolo padrão de choque térmico. Purificação de plasmídeos de bactéria será feito com um protocolo caseiro de miniprep. DNA genômico será extraído usando um protocolo rápido (LiOAc)-SDS/EtOH (LÕOKE 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 serão realizadas usando a polimerase de alta fidelidade Phusion® de acordo com as instruções do fabricante (NEB).

Os plasmídeos usados neste estudo são de uma biblioteca de gRNA clonada em vetores dCas9 com os efetores VPR e Mxi1 e marcador de seleção em noursitrecina (NAT) (BOWMAN et al., 2020). Para construção de vetores dCas9 com diferentes marcadores de seleção, plasmídeos serão digeridos e transformados em *S. cerevisiae* junto ao cassete de seleção adequado. dCas9-Mxi1 será digerido com a enzima de restrição SmaI. *LEU2* e *KanMX* serão amplificados do genoma de *S. cerevisiae* e de vetores já disponíveis no laboratório, respectivamente, com homologia externa ao cassete NAT.

Para clonagem de sgRNAs específicos nos plasmídeos dCas9, sequências alvo ótimas para cada gene serão obtidas na ferramenta CHOPCHOP (LABUN et al., 2019). Novos vetores serão construídos a partir da linearização dos plasmídeos dCas9-Mxi1 com a enzima de restrição SpeI e, posteriormente, clonados a uma sequência de 100 bp contendo o sgRNA em questão por montagem Gibson. Os insertos de 100 bp serão construídos por PCR de anelamento/extensão usando dois oligos de 60 bp, com 20 bp de sobreposição a 3'.

Confirmação das clonagens será realizada por sequenciamento Sanger no equipamento 3500xL (Applied Biosystems) no LGE. Resumidamente, amostras de DNA serão amplificadas em uma reação com Big Dye (Thermo Fischer) com primers específicos e submetidas à análise.

As linhagens BY4742 e PE-2 transformadas com os plasmídeos dCas9 serão cultivadas em YNB CSM-L e YPD G418, respectivamente. O cultivo ocorrerá em triplicata a uma densidade óptica de células inicial igual a 1, 30 ºC e 250 rpm em 50 mL de meio condicionado em Erlenmeyer de 250 mL, vedado com rosca de borracha. Amostras serão coletadas ao longo da fermentação para análise de composição e biomassa. A concentração dos analitos será quantificada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

BIBLIOGRAFIA

ADLI, Mazhar. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, mai. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2.

AKHMETOV, Azat *et al*. Single-step Precision Genome Editing in Yeast Using CRISPR-Cas9. **BIO-PROTOCOL**, v. 8, n. 6, mar. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2765.

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.

BAKKER, B. M. *et al*. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolismo in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 15–37, jan. 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x.

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.

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.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y.-S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-509, nov. 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-003-1450-0.

KIM, Soo R. *et al*. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 851-861, nov. 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.004.

LABUN, Kornel *et al*. Chopchop v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, jul. 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/gkz365.

LEE, Michael E. *et al*. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 9, p. 975-986, abr. 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1021/sb500366v.

LÕOKE, 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.

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.

RANTASALO, Anssi *et al*. Synthetic Toolkit for Complex Genetic Circuit Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, n. 6, p. 1573-1587, mai. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00076.

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.

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.