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]

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

Dr. Fellipe da Silveira Bezerra de Mello (Co-orientador) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O cacaueiro (*Theobroma cacao*) é uma planta endêmica da região amazônica, cujos frutos dão origens 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, as plantações de cacau obtiveram sucesso. Na década de 80, o país alcançou a sua produtividade máxima, chegando a produzir quase 456.000 toneladas de amêndoas, tornando-se assim o 2° maior produtor do mundo (FAOSTAT). Porém, em 1989, foi detectado na Bahia - o maior estado produtor de cacau até então -, o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da Vassoura-de-Bruxa (VDB), reduzindo drasticamente a produção de cacau e gerando consequências como a alta do desemprego e a destruição de parte do bioma nativo, já que os cacauicultores começaram a plantar outras culturas.

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, pós germinação, o fungo apresenta micélio monocariótico e cresce intercelularmente na planta, causando sintomas como a hiperplasia e hipertrofia dos tecidos afetados, perda de dominância apical e formação de hastes anormais - resultando em estruturas chamadas 'vassoura verde' (ALMEIDA, Gabriel Moretti 2014). Já na fase necrotrófica, que ocorre de 2-3 meses após a

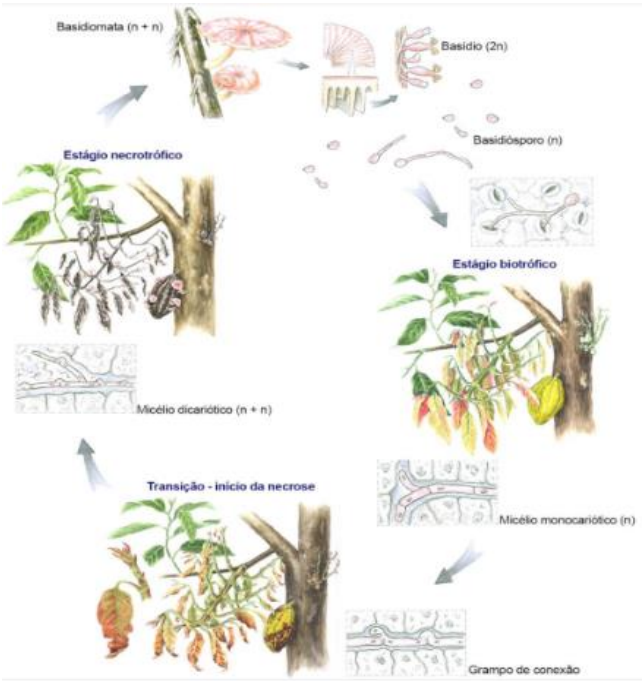

Figura 1Ciclo de vida do fungo Moniliophthora perniciosa. (Fonte: PIRES, Bárbara Aliende. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas).

infecção do fungo, o micélio sofre algumas alterações morfológicas e passa a apresentar hifas dicarióticas e com grampos de conexão. Nesta fase, 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 cacaueiros, 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. E 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. perniciosa* 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.

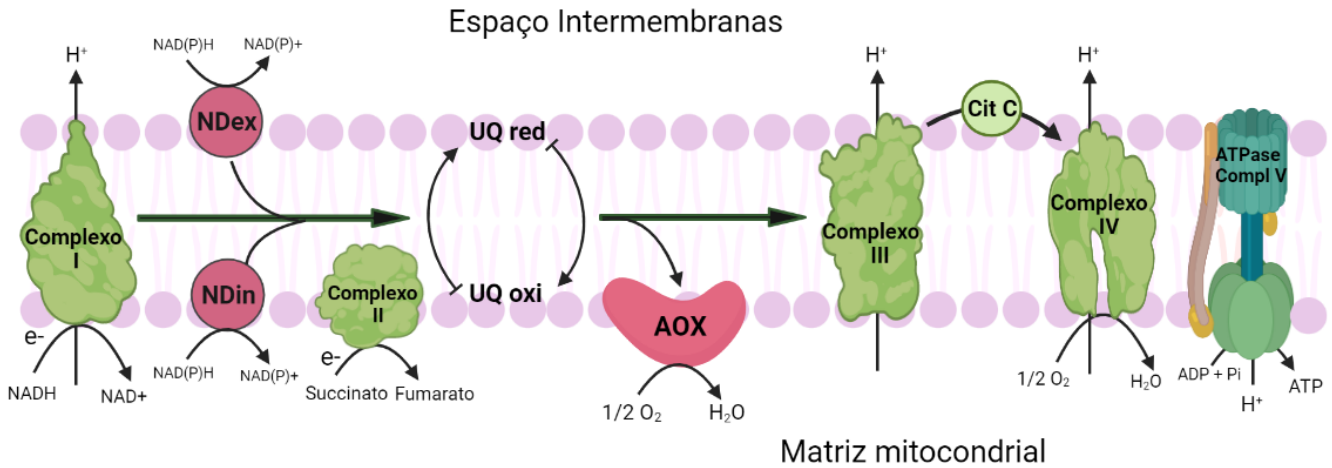

Figura 2Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, incluindo as vias principal (em verde) e alternativa (em rosa).

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. perniciosa* para triagem de moléculas inibidoras de MpAOX se mostra como uma atividade laboriosa e demorada, dada à complexidade do ciclo de vida do fitopatógeno e dificuldade de obtenção de esporos. 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. Estes fatores colaboram para que *P. pastoris* seja também hipotetizada como uma possível

plataforma de expressão de MpAOX, o que poderia contribuir para triagem de inibidores específicos desta enzima.

Um desafio na manipulação genética de *P. pastoris* é que sua maquinaria de reparo de DNA por recombinação homóloga (HR) é menos eficaz que em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, 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). Portando, cepas ku70Δ desta levedura apresentam taxa de reparo pela maquinaria NHEJ reduzida, de forma que a taxa de recombinação homóloga é favorecida e se torna mais eficiente (NÄÄTSAARI, Laura 2012). Com 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**).

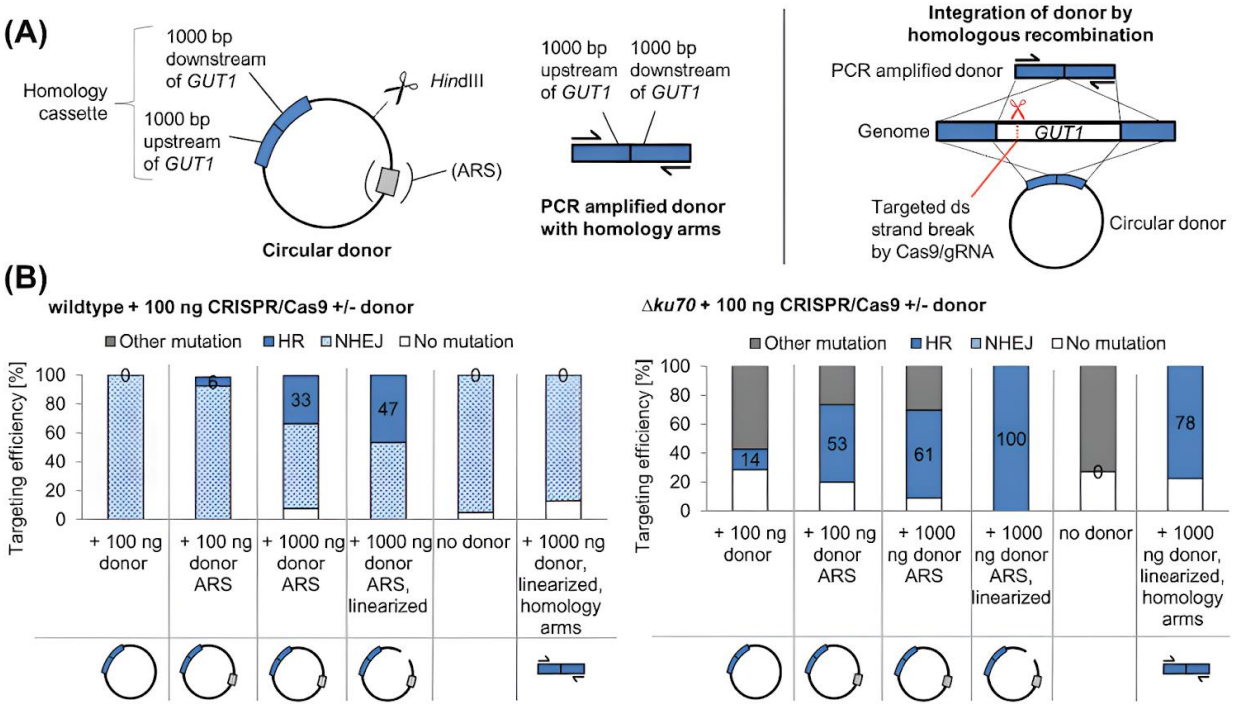

Figura 3 *ARSs promovem integração eficiente mediada por CRISPR/Cas9 de fragmentos doadores sem marcadores na cepa de tipo selvagem de P. pastoris. A- Desenho dos cassetes doadores (lado esquerdo) e eventos de recombinação direcionados (lado direito). B- P. pastoris tipo selvagem (lado esquerdo) e Δku70 (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 e prática (WENINGER, Astrid et al. 2018). CRISPR-Cas9 é um sistema de edição genômica, inicialmente encontrado em bactérias e *archaea*, que faz uso de uma sequência curta de RNA para guiar a nuclease 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. Assim, espera-se construir uma plataforma para triagem de moléculas inibidoras de MpAOX.

METODOLOGIA:

Etapas	Atividades
Vetores e Clonagem	Amplificação de sequências do vetor pPBLp_004 (contendo gRNA para edição PpAOX) com primers contendo região modular para inserção de gRNA
	Montagem do plasmídeo pLC_004 (TEF1-Cas9-CYC1 SNR52-gRNA-SUP4) a partir de recombinação homóloga em *Saccharomyces cerevisiae*
	Montagem do plasmídeo pLC_004.01 para inserção de um gRNA homólogo à sequência de KU70
Transformação de *P. pastoris*	Transformação de *P. pastoris* com plasmídeo pLC_004.01
	Confirmação de uma linhagem *P. pastoris* ku70 (nomeada LCY001)
	Linearização e purificação do plasmídeo de expressão de MpAOX (pUC57_MpAOX) contendo 400 bp de homologia upstream e downstream à PpAOX
	Transformação de LCY001 usando plasmídeo pPBLp_004 e pUC57_MpAOX linearizado
	Confirmação da linhagem *P. pastoris* ku70 MpAOX (LCY002)
Caracterização fenotípica de *P. pastoris*	Fenotipagem da linhagem LCY002 sob diferentes inibidores de AOX

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O projeto encontra-se em seu segundo mês de atividades e até o momento as principais atividades serão descritas a seguir. Para a primeira atividade, onde objetiva-se a construção de vetor modular para edição de *P. pastoris* usando o sistema CRISPR-Cas9, foram realizadas PCR para amplificação do vetor pPBLp_004 (disponível na biblioteca de plasmídeos do laboratório) (**FIGURA 4**) a fim de se alterar a sequência original de sgRNA através de clonagem das partes amplificadas. Entretanto, foi observado que, diferente do esperado, o segmento do plasmídeo que deveria conter uma sequência de origem de replicação pARS1 de *P. pastoris*, o tamanho da banda ob tida sugere que o vetor pPBLp_004 seja na realidade para edição de *S. cerevisiae* (**FIGURA 5**). Portanto, para prosseguimento das atividades, será utilizado o vetor pGS_004.0 (DE MELLO, Fellipe *et al.* 2022), contendo as estruturas específicas para edição CRISPR-Cas9 em *S. cerevisiae*, a partir do qual será integrado a origem de replicação pARS1. Tal atividade encontra-se em andamento e o planejamento foi

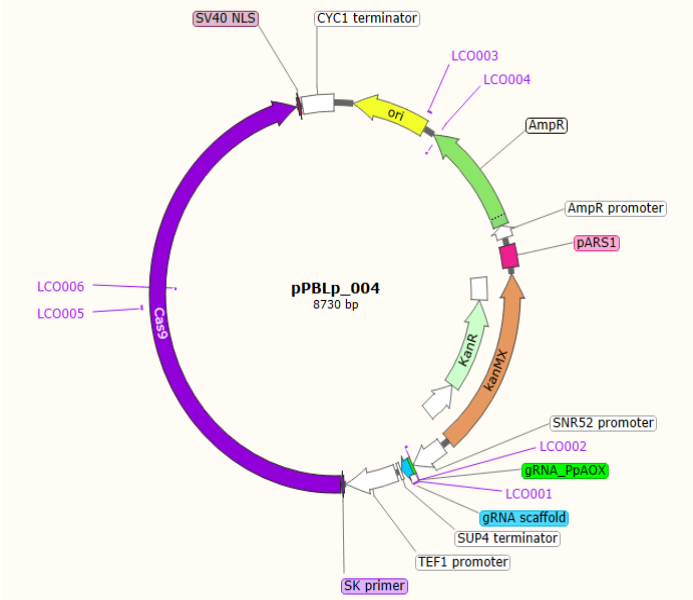

Figura 4Vetor pPBLp_004. Em roxo os primers utilizado para amplificação.

realizado de forma que o vetor pGS004.0 será digerido com a enzima PflMI e posteriormente a clonagem de pARS1 – amplificado do genoma de *P. pastoris* – será realizada via transformação em levedura.

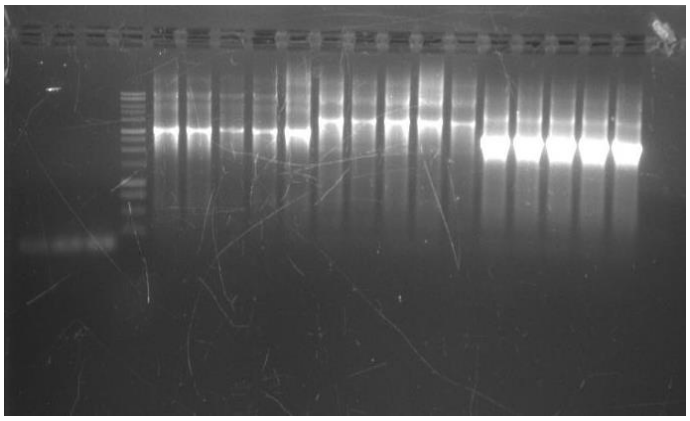

Figura 5Foram realizadas 5 reações de PCR à diferentes temperaturas (50°C; 52°C; 54°C; 56°C e 58°C) para cada par de primers, além de um controle para cada par.
Pares de primers- (1) LCO_004 + LCO_005 - 3146 pb; (2) LCO_003 + LCO_002 - 3032 pb; (3) LCO_001 + LCO_006 - 2842 pb.
Da esquerda para direita- Controles (1), (2), (3), respectivamente. Marcador molecular 1Kb. 5 Reações para o 1° par de primers. 5 Reações para o 2° par de primers. 5 Reações para o 3° par de primers.
Todas as temperaturas deram certo, e os três primers amplificaram a parte desejada, porém o 2° par amplificou uma região maior que a esperada, que condiz com a região de replicação autônoma da Saccharomyces cerevisiae e não com a região de replicação autônoma da Pichia pastoris (PARS1).

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

BRACHMANN, C 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 (Chichester, England) vol. 14,2 (1998): 115-32. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production- Crops and livestock products. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Acesso em: 28 mar. 2022

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; REZAEE, 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.