

Regulação moderada da expressão de *XKS1* usando CRISPR-dCas9 para otimização do metabolismo de xilose em *S. cerevisiae*

Palavras-Chave: CRISPR/dCas9, Xilose, *Saccharomyces cerevisiae*

Autores(as):

Laura Diniz, IB – UNICAMP

Prof. Dr. Fellipe da Silveira Bezerra de Mello (orientador), IB - UNICAMP Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (coorientador), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A busca por energias limpas é essencial para reduzir os danos causados pelo uso de combustíveis fósseis. À vista disso, o bioetanol de segunda-geração (E2G) de cana-de-açúcar se demonstra como uma alternativa eficiente para descarbonizar a matriz energética. O bagaço residual da produção de etanol de primeira geração, bem como a palha da planta descartada durante a colheita, é rico em hemicelulose composta por pentoses, como a xilose², matéria-prima para produção do E2G.

Porém, apesar de existirem alguns fungos capazes de converter xilose em etanol, estas espécies não possuem a mesma capacidade fermentadora em condições industriais que a *S. cerevisiae*^{3,4}. Neste sentido, a engenharia metabólica desta levedura se torna a opção mais rentável para a produção industrial de E2G atualmente. A *S. cerevisiae* é um microrganismo modelo, não patogênica, eficiente fermentadora e robusta aos estresses industriais se comparada às outras leveduras, tornando-a o principal chassi microbiano usado em biorrefinarias³. Por outro lado, mesmo não sendo fermentadora natural da xilose, é capaz de metabolizar a xilulose, produto isomerizado da xilose, em etanol.

Dentre as ferramentas de edição genética, o sistema CRISPR-Cas9 tem se consolidado como a técnica mais versátil e eficiente em *S. cerevisiae*. O sistema CRISPR (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) surgiu como forma de sistema imune adaptativo em procariotos e archeas e consiste no uso de uma fita de RNA (gRNA) que direciona a endonuclease Cas9, proveniente de *Streptococcus pyogenes*, a uma região específica do genoma onde ocorrerá a clivagem de uma sequência desejada na fita de DNA^{5,6}.

Todavia, as edições binárias de deleção ou forte superexpressão possibilitadas pelo método muitas vezes são insuficientes para atingir um fenótipo de interesse. A integração de múltiplas cópias

de um gene que poderia ser benéfica pode causar um fardo metabólico negativo, ou ainda o efeito da repressão da expressão de genes essenciais se torna desafiadora. Logo, para flexibilizar a modulação da expressão gênica, a ferramenta CRISPR-dCas9, onde a endonuclease Cas9 é inativada (*dead* Cas9 ou dCas9) por mutações que impedem a clivagem da dupla-fita do DNA, se torna uma alternativa ao estudo da inibição (CRISPRi) ou ativação (CRISPRa) da transcrição genética de genes alvo⁷.

Lançando mão desta ferramenta, o atual projeto visa estudar o efeito da ativação da expressão do gene *XKS1*, responsável pela transcrição de uma xiluloquinase⁸⁻¹⁰ em *S. cerevisiae* e seu efeito no metabolismo de xilose. Para tal, a endonuclease dCas9 será fusionada ao complexo proteico ativador VPR para superexpressão do gene em questão. Assim, pretende-se aumentar a taxa de conversão de xilose a xilulose, e por fim, o rendimento de etanol produzido a partir de xilose em *S. cerevisiae*

METODOLOGIA:

A linhagem de *S. cerevisiae* laboratorial BY4742 (MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0)¹¹ foi utilizada nos experimentos de modulação da expressão de genes alvos da via PPP 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. YNB (6.7 g. L⁻¹ base nitrogenada para levedura, 20 g. L⁻¹ glicose), CSM-U (500 mg. L⁻¹ dropout de aminoácidos sem L-Uracila), ou YPD suplementado com 200 μ g. mL⁻¹ de geneticina G418 foram usados para seleção de células transformadas com marcador URA3 ou KanMX, respectivamente. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e 250 rpm, quando necessária agitação. *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada 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.

Os plasmídeos CRISPR-dCas9 utilizados neste estudo foram anteriormente descritos por Cámara *et al* (2020)¹³. Para clonagem de gRNAs específicos nos plasmídeos dCas9, sequências alvo ótimas para cada gene foram obtidas, utilizando os parâmetros fornecidos pelos softwares Yeast CRISPRi XI¹⁴ e CRISPR-era¹⁵. Um vetor contendo uma xilose isomerase (*xylA*) de *Orpinomyces* foi usado para possibilitar o consumo de xilose pelas cepas de levedura selecionadas.

A transformação de levedura foi realizada através do método PEG/LiAc, descrito por Gietz e Schietls (2007). A 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 será extraído usando um protocolo rápido (LiOAc)-SDS/EtOH para uso em reação em cadeia da polimerase (PCR), ou pelo método Fenol/Clorofórmio para ensaios de sequenciamento. reações de PCR foram realizadas usando a polimerase de alta fidelidade Phusion® (NEB).

As leveduras transformadas com os plasmídeos dCas9-VPR para regulação de *XKS1*, junto com o vetor de expressão de *xyIA* serão cultivadas em YNB CSM-U e YPD G418, respectivamente, contendo 2% xilose. O cultivo ocorrerá em triplicata a uma densidade óptica de células inicial igual a 1, 30 °C 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)

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Transformação de uma linhagem de *S. cerevisiae* com um vetor de expressão de xilose isomerase

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram preparadas e usadas para propagação e manutenção do vetor pXI de alta cópia (**Figura 1A**) contendo um cassete de expressão de xilose isomerase *xyIA* de *Orpinomyces* sp. (GAPp-OrpXylA-CYC1t; URA3), XIOrp, utilizada para habilitar o fenótipo de consumo de xilose na cepa de *S. cerevisiae* laboratorial BY4742 *gre3* Δ URA⁻. A transformação da levedura com XIOrp foi feita empregando o método PEG/LiAc. Então, foi realizada a confirmação das cepas expressando o gene desejado por meio de reações de PCR utilizando a polimerase GoTaq (**Figura 1B**).

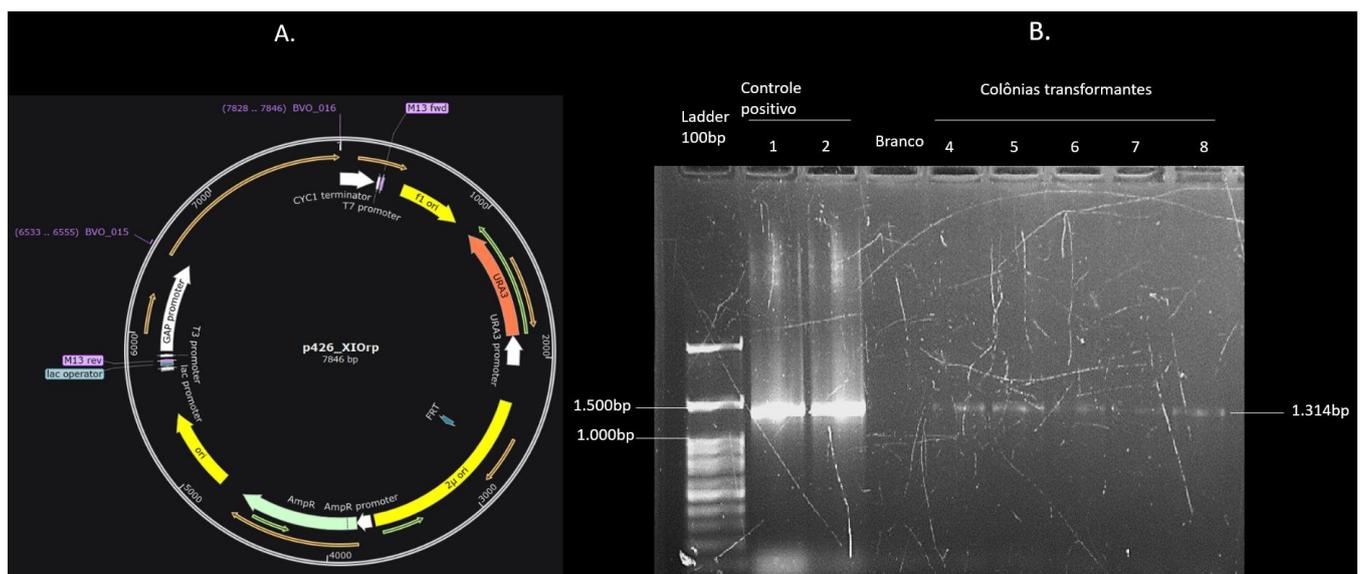


Figura 1: A - Mapa do vetor pXI de *Orpinomyces* sp. evidenciando os primers utilizados para amplificação por PCR. // B- Gel de eletroforese (1%) do produto das reações de PCR de confirmação da transformação da cepa BY4742 *gre3* Δ com uma Xilose Isomerase de *Orpinomyces* sp. Como controle positivo, estão as reações de PCR das duas minipreps do plasmídeo inteiro.

Desenho dos sgRNAs em diferentes regiões promotoras de *XKS1*;

Foram escolhidas e desenhadas quatro sequências de sgRNAs ótimas para região promotora do gene *XKS1* em diferentes posições em relação ao TSS (*Transcription Start Site*), utilizando os softwares Yeast CRISPRi XI¹³ e CRISPR-era¹⁴. O primeiro software avalia principalmente possibilidades de *off-targets* e a presença de GC na sequência do DNA enquanto o último avalia a ocupação da região por

nucleossomos e acessibilidade da cromatina. As regiões selecionadas com base nos melhores parâmetros, sobrepondo ambos os *softwares*, estão descritas na Tabela 1.

ID	Sequence	Distance to TSS	Nucl.	ATAC-seq	E score	S score	E+S score
3	TCGTCCGCCTGAGATTGCAT	-51	0	0.9	20	0	20
7	GTGACAATGTTATTAAATCG	-198	0.53	0.06	20	0	20
9	TTTCATTCTGATGGAATAA	-312	0.12	0.05	15	0	15
12	GTTTTGCTTATTAAGGGTCT	-460	0	0.24	10	0	10

Tabela 1: Sequências escolhidas para os quatro gRNAs que foram utilizados na expressão modulada de *XKS1*. Sendo o gRNA 1 o com a menor distância ao TSS e o gRNA 4 o que possui a maior distância ao TSS.

Construção dos vetores dCas9-VPR contendo os sgRNAs

Inicialmente, o vetor dCas9-VPR (**Figura 2A**) foi amplificado e extraído por miniprep de bactéria, a ser usado para a modulação positiva do gene *XKS1*. O DNA foi purificado e posteriormente digerido com a enzima BbsI. A construção dos dsOligos com as sequências de sgRNA foi realizada por hibridização do par de primers correspondente, contendo as sequências de sgRNA (**Tabela 1**). Para a clonagem do sgRNA no vetor dCas9-VPR linearizado, foi realizada técnica de recombinação *in vivo* em uma cepa BY4742 pela transformação com o método LiAc. A confirmação da clonagem dos sgRNA foi feita por PCR (**Figura 2B**).

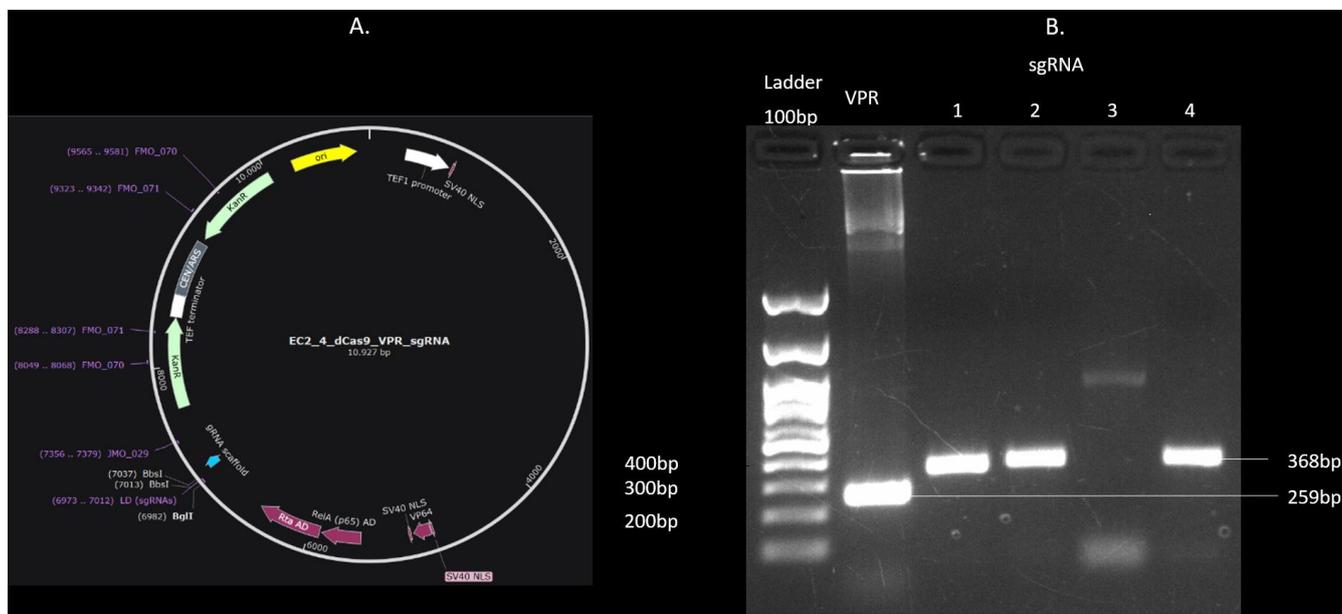


Figura 2: **A** - Mapa do vetor dCas9-VPR evidenciando a região de corte da enzima BbsI, os primers usados para amplificação das sequências no PCR e os genes presentes no plasmídeo. // **B** - Gel de eletroforese (1% de agarose) com as reações de PCR com a polimerase GoTaq de algumas colônias transformantes. O tamanho esperado das bandas era de 368 bp. O controle positivo é a reação de PCR da miniprep do vetor dCas9-VPR. O anelamento entre o vetor dCas9-VPR com o sgRNA 3 não foi confirmado, o projeto seguiu apesar disso, com os outros três vetores dCas9-VPR + sgRNAs confirmados.

Após a montagem dos vetores dCas9, o último passo antes de seguir para as fermentações é a construção de uma cepa contendo ambos os plasmídeos: XIOrp e o vetor dCas9-VPR com as sequências codificadoras dos sgRNAs específicos. Etapa que está sendo realizada no momento.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Huiling Long, Xiaobing Li, Hong Wang, Jingdun Jia, **Biomass resources and their bioenergy potential estimation: A review**, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 26, 2013, Pages 344-352, ISSN 1364-0321,
- 2 Dias M., Cavalett O., Maciel Filho R., Bonomi A., 2014, **Integrated First and Second-Generation Ethanol Production from Sugarcane**, *Chemical Engineering Transactions*, 37, 445-450.
- 3 Cadete, R.M., de las Heras, A.M., Sandström, A.G. et al. **Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae***. *Biotechnol Biofuels* 9, 167 (2016).
- 4 Kim SR, Park YC, Jin YS, Seo JH. **Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism**. *Biotechnol Adv.* 2013 Nov;31(6):851-61
- 5 **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2016
- 6 Mari Cleide Sogayar, Mariele Santos Moraes-Almeida, Henrique César Jesus-Ferreira, Camila Leal- Lopes, Ana Claudia Oliveira Carreira, Raquel Arminda Carvalho Machado. **Edição Gênica por CRISPR/Cas9: Da Teoria à Prática**.
- 7 sy Ho, N. W. Y., Chen, Z. & Brainard, A. P. **Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose**. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 64 (1998).
- 8 Deng XX, Ho NW. **Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene**. *Scientific note. Appl Biochem Biotechnol.* 1990 Spring- Summer;24-25:193-9. doi: 10.1007/BF02920245. PMID: 2162148.
- 9 Jeffries, T. W. **Engineering yeasts for xylose metabolism**. *Current Opinion in Biotechnology* vol 2. 320–326 (2006).
- 10 Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B. **Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures**. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Aug;66(8):3381-6.
- 11 Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). **Designer deletion strains derived from *Saccharomyces Cerevisiae* S288C: A useful set o strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications**. *Yeast*, 14(2), 115–132.
- 12 Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). **High-efficiency yeast transformation using the LIAC/SS carrier DNA/peg method**. *Nature Protocols*, 2(1), 31–34.
- 13 Cámara, E., Lenitz, I. & Nygård, Y. **A CRISPR activation and interference toolkit for industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain KE6-12**. *Sci Rep* 10, 14605 (2020).
- 14 Smith JD, Suresh S, Schlecht U, Wu M, Wagih O, Peltz G, Davis RW, Steinmetz LM, Parts L, St Onge RP. **Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design**. *Genome Biol.* 2016 Mar 8;17:45. doi: 10.1186/s13059-016-0900-9. PMID: 26956608; PMCID: PMC4784398.
- 15 Liu H, Wei Z, Dominguez A, Li Y, Wang X, Qi LS. **CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation**. *Bioinformatics.* 2015 Nov 15;31(22):3676-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btv423. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26209430; PMCID: PMC4757951.