



UNICAMP



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 [FCF UNICAMP]

Gustavo Seguchi [IB UNICAMP]

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

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

INTRODUÇÃO

O cacaueteiro (*Theobroma cacao*) é uma planta endêmica da região amazônica, cujas amêndoas possuem valor comercial por servirem de matéria-prima na área industrial (PIRES, Bárbara 2020). No Brasil, 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 basidiomiceto e hemibiotrófico, ou seja, tem duas fases de crescimento, biotrófica e necrotrófica (FORMIGHIERI, Eduardo 2006). Na fase biotrófica, os basidiósporos penetram na planta através de tecidos lesados, infectando os tecidos meristemáticos e retirando seus nutrientes, causando assim, sintomas como a hiperplasia e hipertrofia (ALMEIDA, Gabriel Moretti 2014). Já na fase necrotrófica o fungo cresce dentro das células da planta, causando necrose e morte dos tecidos infectados.

Durante a infecção dos cacaueteiros, 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 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 1**). 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, mantendo o ciclo infeccioso da VDB.

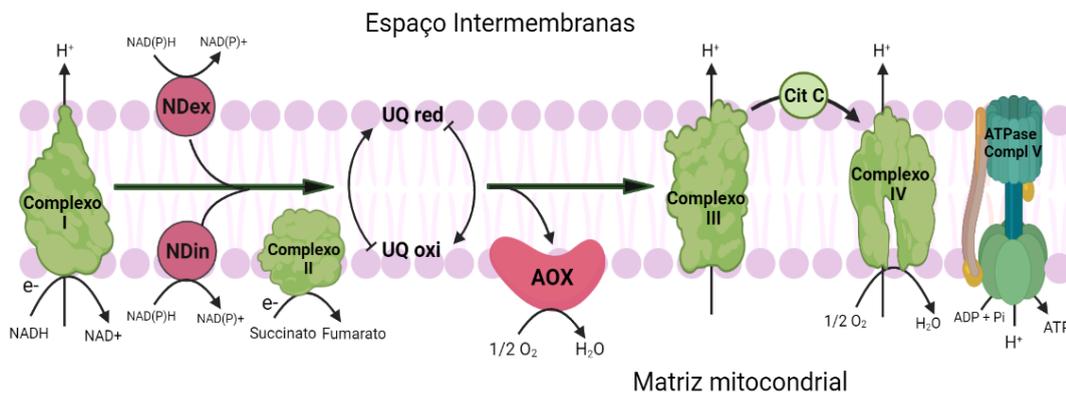


Figura 1 Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, incluindo as vias principal (em verde) e alternativa (em rosa).

Sendo assim, a MpAOX torna-se um fator crucial para a sobrevivência e virulência do fitopatôgeno, 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, dada à complexidade do ciclo de vida do fitopatôgeno. 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 2**).

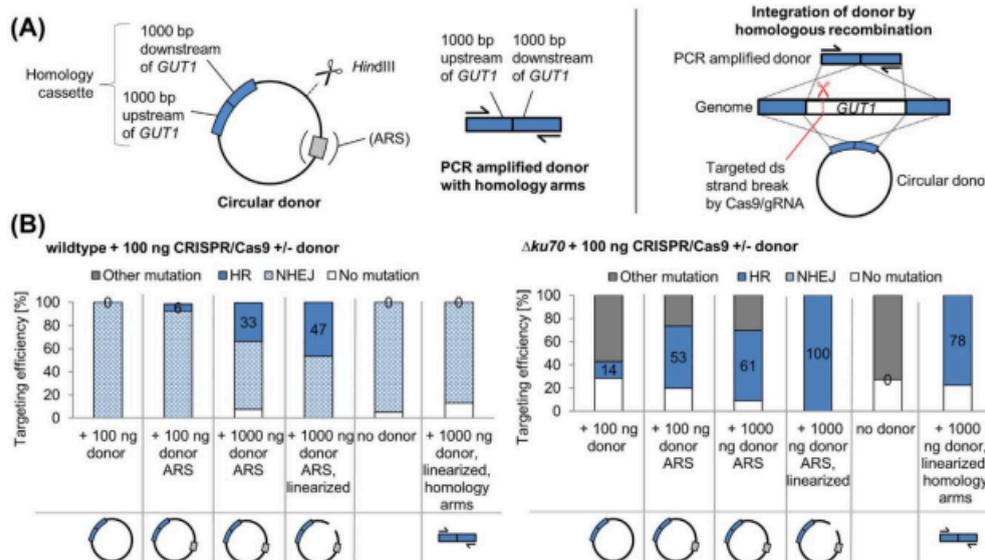


Figura 2 ARSs promovem integração eficiente mediada por CRISPR/Cas9 de fragmentos doadores sem marcadores na cepa de tipo selvagem de *P. pastoris*. A- Desenho dos cassetes doadores (lado esquerdo) e eventos de recombinação direcionados (lado direito). B- *P. pastoris* tipo selvagem (lado esquerdo) e $\Delta ku70$ (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:

Etapas	Atividades
Desenvolvimento de uma linhagem <i>P. pastoris</i> com maior taxa de HR através da Δ KU70	utilização do plasmídeo pGS_004.0 para inserção de um gRNA homólogo à sequência de KU70
	Transformação de <i>P. pastoris</i> com plasmídeo pGS_004.0 + gRNA para Δ KU70
	Confirmação de uma linhagem <i>P. pastoris</i> KU70 (LCY001)
Substituição da AOX endógena de <i>P. pastoris</i> por uma MpAOX	Linearização e purificação do plasmídeo de expressão de MpAOX (pUC57_MpAOX) contendo 400 bp de homologia upstream e downstream à PpAOX
	Montagem do plasmídeo pLC_004.02 para inserção de um gRNA homólogo à sequência de PpAOX
	Transformação de LCY001 usando plasmídeo pLC_004.02 e pUC57_MpAOX linearizado
	Confirmação da linhagem <i>P. pastoris</i> KU70 MpAOX (LCY002)
Caracterização da linhagem modificada a inibidores de AOX	Fenotipagem da linhagem LCY002 sob diferentes inibidores de AOX

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para início do projeto tínhamos como objetivo deletar o gene KU70, que está intrinsecamente ligado à alta taxa de reparo de DNA por extremidades não homólogas em *Pichia pastoris*. Para isso, linearizamos, com a enzima de restrição Esp3I, o vetor pGS_004.0, disponível da biblioteca de plasmídeos do laboratório, e utilizamos o protocolo sgRNA Oligo Annealing and Ligation e os primers hibridizados LCO_007 e LCO_008 para fazer a inserção do sgRNA ao vetor. Em seguida, foi realizada a transformação em *P. pastoris*, extração e amplificação do gDNA para sequenciamento. (Figura 3)

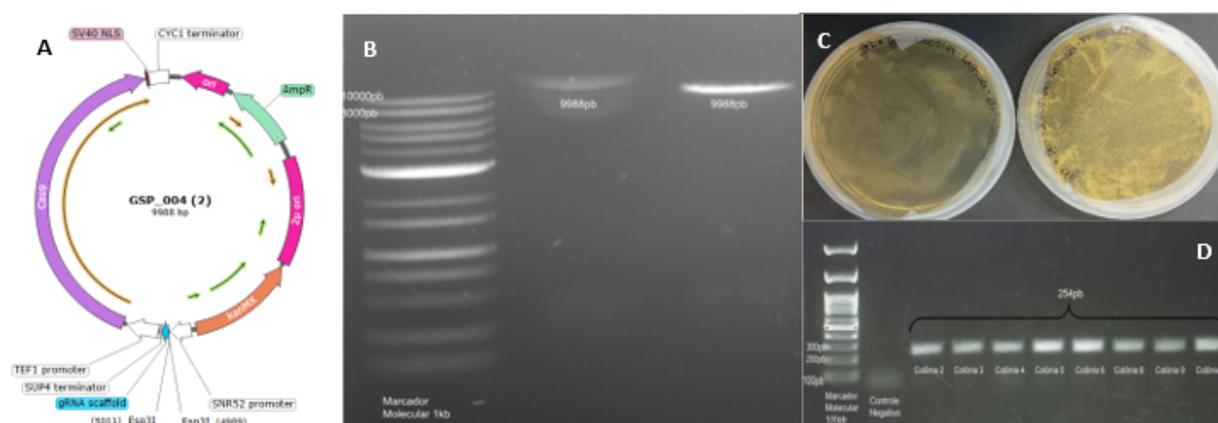


Figura 3 A) Mapa do plasmídeo PG5004.0. B) Gel de Agarose 1%. Da esquerda para direita: Marcador molecular 1Kb, pGS_004.0 fechado e pGS004.0 linearizado com Esp3I. C) Transformação de *Pichia pastoris* com o vetor da figura A. D) Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação do gene KU70 (254pb) de 10 colônias da transformação, foram utilizados os primers LCO_018 e LCO_019.

Nas amostras enviadas para sequenciamento não obtivemos o resultado esperado. Portanto seguimos para a próxima etapa do projeto, deletar através do sistema CRISPR-Cas9 o gene PpAOX. Para isso, utilizamos o vetor pPBLp_004 (FAPESP 2016/24264-5 e 2018/03130-6) disponível no laboratório com o sgRNA Δ PpAOX e realizamos a transformação em *Pichia pastoris*. Após a transformação foram feitos backups de 190 colônias para posterior teste de fenotipagem. **(Figura 4)**

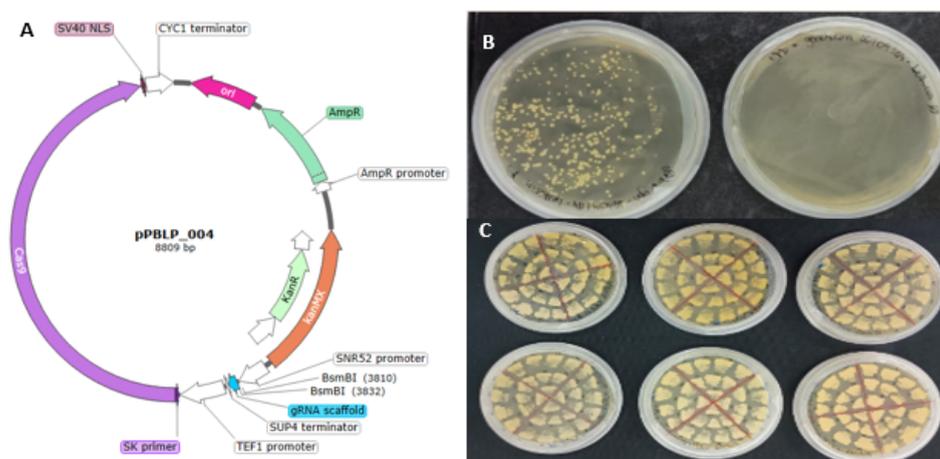


Figura 4 A) Mapa do plasmídeo pPBLP_004 B) da esquerda para direita: Placa YPD transformação de *Pichia* com o vetor da figura A + sgRNA Δ PpAOX e placa de YPD controle. C) Backup das 190 colônias da transformação da placa da esquerda na figura B

A partir dos backups foram realizados pré-inóculos de 188 colônias em placa de 96 poços contendo YPG 3% e depois feito o inóculo em placas de YPG 3% e YPG 3% + Azoxistrobina [0,5mg/L], em placa YPG 3% esperava-se o crescimento de todas as colônias, já em placa YPG 3% + Azoxistrobina [0,5mg/L] esperava-se o crescimento apenas das colônias não editadas (1* e 2*). **(Figura 5)**

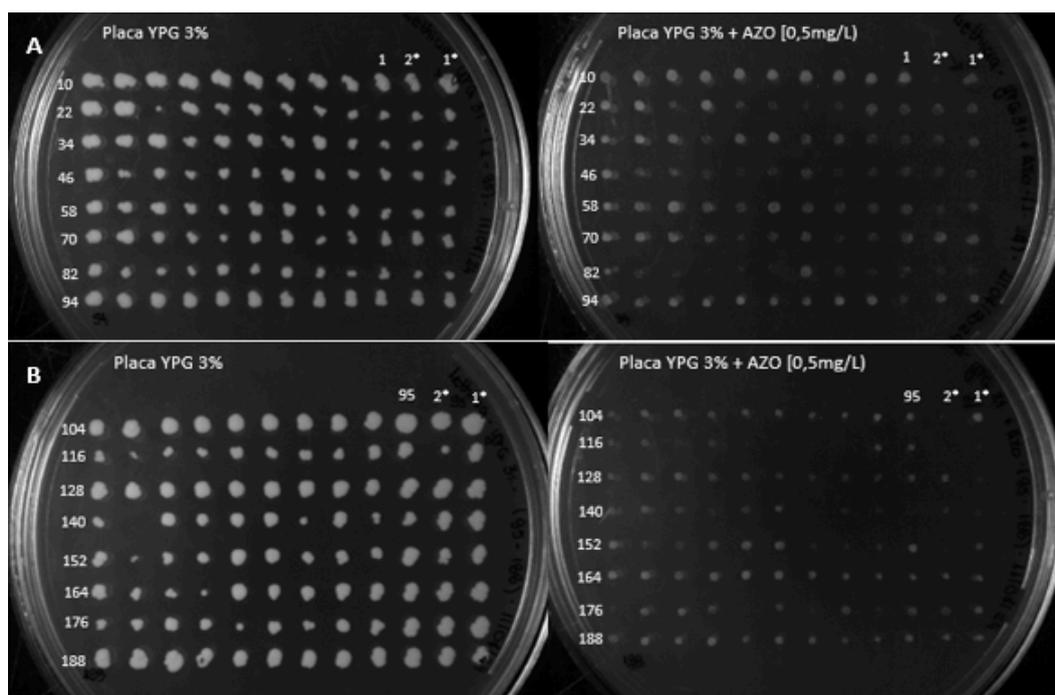


Figura 5 A) Da esquerda para direita: Placa YPG 3% colonias controle (*Pichia* não editada 1* e 2*) colonias editadas de 1 a 94, Placa YPG 3% + AZO [0,5mg/L] colonias controle (*Pichia* não editada 1* e 2*) colonias editadas de 1 a 94 B) Placa YPG 3% colonias controle (*Pichia* não editada 1* e 2*) colonias editadas de 95 a 188, Placa YPG 3% + AZO [0,5mg/L] colonias controle (*Pichia* não editada 1* e 2*) colonias

Após o teste de fenotipagem foram realizados testes de diluição seriada com 11 colônias que apresentaram menor taxa de crescimento no teste anterior. O plaqueamento foi feito em placas YPG 3%, YPG 3% + Azoxistrobina [0,5mg/L] e YPG 3% + Azoxistrobina [1mg/L] e os registros foram feitos em 2 e 5 dias após o plaqueamento. (Figura 6)

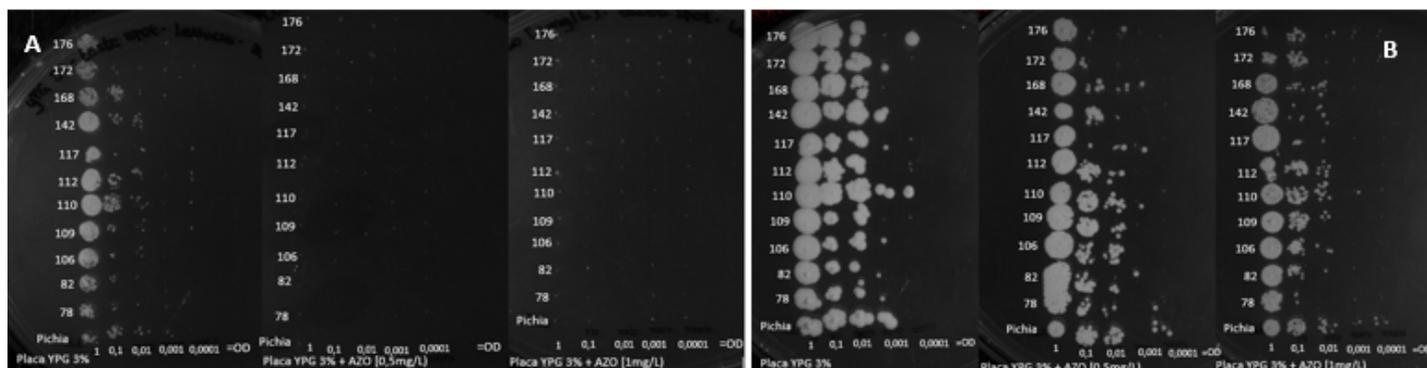


Figura 6 A) Da esquerda para direita: Placa YPG 3%, Placa YPG 3% + AZO [0,5mg/L] e Placa YPG 3% + AZO [1mg/L]- colonia controle (pichia não editada ultima e) colonias editadas (78, 82, 106, 109, 110, 112, 117, 142, 168, 172 e 176). foto com dois dias de crescimento. B) Da esquerda para direita: Placa YPG 3%, Placa YPG 3% + AZO [0,5mg/L] e Placa YPG 3% + AZO [1mg/L]- colonia controle (pichia não editada ultima e) colonias editadas (78, 82, 106, 109, 110, 112, 117, 142, 168, 172 e 176). foto com seis dias de crescimento.

CONCLUSÕES:

Até o presente momento, apesar da edição para deleção do gene KU70 com CRISPR-Cas9 ter se mostrado desafiadora, a deleção de PpAOX através do mesmo sistema de edição se mostrou promissora, já que pode-se observar uma menor taxa de crescimento nas colônias editadas e também um tempo maior para visualização do crescimento dessas colônias. O que era esperado tendo em vista que a AZO paralisa a cadeia respiratória principal. Portanto para continuidade do projeto pretendemos realizar a integração do gene MpAOX em *Pichia pastoris* e testar as possíveis drogas inibidoras de MpAOX.

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.