

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Isabella Frighetto Bomfiglio

Desenvolvimento *in vitro* de vetores hipermodularizados para a edição de genes e genomas de leveduras de interesse industrial

Porto Alegre
2023

Isabella Frighetto Bomfiglio

Desenvolvimento *in vitro* de vetores hipermodularizados para a edição de genes e genomas de leveduras de interesse industrial

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharela em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientação: Prof. Dr. Diego Bonatto

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Bomfiglio, Isabella Frighetto
Desenvolvimento in vitro de vetores
hipermodularizados para a edição de genes e genomas de
leveduras de interesse industrial / Isabella Frighetto
Bomfiglio. -- 2023.
48 f.
Orientador: Diego Bonatto.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Biologia Sintética. 2. CRISPR-Cas. 3. Vetores
Modularizados. 4. Golden Gate. 5. Leveduras
Industriais. I. Bonatto, Diego, orient. II. Título.

Isabella Frighetto Bomfiglio

Desenvolvimento *in vitro* de vetores hipermodularizados para a edição de genes e genomas de leveduras de interesse industrial

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharela em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Bonatto

Prof. Dr. Charley Christian Staats

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

RECURSOS FINANCEIROS PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido com verbas públicas oriundas da Chamada CNPq/MCTI/CT-BIOTEC N° 30/2022 - Linha 2: Novas tecnologias em Biotecnologia Edital (Processo Número 440226/2022-8), da FAPERGS 02/2022 INOVA CLUSTERS TECNOLÓGICOS (Processo Número 21/2551-0001958-1) e do EDITAL FAPERGS 06/2021 PROGRAMA DE REDES INOVADORAS DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO RIO GRANDE DO SUL – RITEs-RS (Processo Número 22/2551-0000397-4).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente à minha mãe, Daniela Frighetto, que é meu porto seguro e meu farol, que me encoraja todos os dias a encarar a vida com leveza e coragem. Espero um dia ser tão iluminada quanto tu és, mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me incentivou a trilhar minhas próprias escolhas, principalmente à minha mãe, Daniela, que desde cedo me ensinou a ser uma mulher forte e persistente. Agradeço pelo apoio que foi fundamental para eu ter chegado até aqui.

Às melhores amigas que eu poderia ter, Ana Paula, Júlia e Luiza, que me conhecem como ninguém e sempre estiveram comigo nos altos e baixos. Amo vocês incondicionalmente.

Ao André, que enche minha vida de ternura. Agradeço por ter acompanhado toda a trajetória de criação deste trabalho ao meu lado, me encorajando a persistir com leveza.

À Lika, que nunca mediu esforços para acalmar a tempestade quando tudo parecia cinza. Obrigada por sempre me ouvir e me entender.

Agradeço às amigas que fiz dentro da universidade, em especial o “Grupo do Desespero”, Laura B., Laura H. e Camila, que tem um lugar reservado em meu coração. Agradeço, também, ao Guilherme, Lucca e Matheus, por tornarem meus dias sempre mais alegres.

Agradeço a todos os discentes do laboratório LBCM, onde este trabalho foi executado, pela receptividade e paciência. Sem a ajuda de vocês este projeto não seria possível (ou não tão divertido de ser realizado). Agradecimento especial ao meu orientador, Diego Bonatto, que me ensinou boa parte do que aprendi sobre biologia molecular e microbiologia nestes anos de graduação, e me inspira como futura profissional. Obrigada, professor, pela oportunidade.

“É durante as fases de maior adversidade que surgem as grandes oportunidades de se fazer o bem a si mesmo e aos outros.”

Dalai Lama

RESUMO

As tecnologias de edição gênica baseadas no uso das nucleases associadas com repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR-Cas) vem ganhando destaque por serem consideradas eficientes, simples e de baixo custo para aplicações em diferentes campos de pesquisas, incluindo biotecnologia de microrganismos, especialmente para leveduras de uso industrial. Neste sentido, o uso da Biologia Sintética (BioSin) facilita a criação de ferramentas moleculares que modularizam, padronizam e ortogonalizam a CRISPR-Cas, possibilitando adequar a ferramenta para quaisquer contextos biológicos, aumentando a taxa de eficiência de protocolos de edição gênica. Sendo assim, a técnica de Golden Gate, que faz uso de enzimas de restrição do tipo IIS para a concatenação de partes de DNA, permite que vetores para a edição gênica sejam gerados de forma rápida e em um único passo reacional, acelerando consideravelmente a geração de protótipos de vetores e de chassis de leveduras industriais editadas. Sendo assim, o propósito deste projeto foi gerar um vetor hipermodularizado para a inserção de diferentes sequências codificantes para Cas9/Cas12a, marcas de seleção de transformantes de leveduras e origens de replicação de DNA de leveduras. O vetor base hipermodularizado pModCas2C foi aplicado para a criação de dois vetores bi-funcionais em uma única reação do tipo Golden Gate, um contendo a sequência codificante para Cas9 e outro a sequência para Cas12a, além de uma marca de prototrofia para uracila e a origem de replicação episomal 2 micra de *Saccharomyces cerevisiae* (vetores pCas9U2micra e pCas12U2micra, respectivamente). Para acelerar a prototipagem e a seleção do pCas9U2micra, foi desenvolvido um *pipeline* de transformação de *S. cerevisiae* seguido do uso de *Escherichia coli* associado à técnica de PCR de colônias do tipo multiplex. A aplicação deste *pipeline* possibilitou obter o vetor pCas9U2micra de forma rápida. Porém, tanto a técnica de Golden Gate quanto o pipeline de prototipagem vetorial usados neste projeto se mostraram de baixa eficiência, abrindo espaço para otimizações futuras destas técnicas visando a obtenção de vetores de edição gênica de forma rápida e em grande escala.

Palavras chaves: biologia sintética; vetores modularizados; CRISPR-Cas; Golden Gate; leveduras industriais.

ABSTRACT

Gene editing technologies based on the use of nucleases associated with clustered and regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas) have been gaining attention because they are considered efficient, simple, and inexpensive for applications in different fields of research, including industrial yeasts. Synthetic Biology (SynBio) facilitates the creation of molecular tools that modularize, standardize, and orthogonalize CRISPR-Cas, making it possible to adapt the tool to any biological context, increasing the efficiency rate of gene editing protocols. For example, the Golden Gate technique uses type IIS restriction enzymes to concatenate parts of the DNA, allowing the generation of vectors quickly and in a single reaction step, considerably accelerating the generation of industrial yeast vectors and edited yeast chassis prototypes. Therefore, this project aimed to generate a hypermodularized vector for inserting different coding sequences for Cas9/Cas12a, yeast transformant selection marks, and yeast DNA replication origins based on the Golden Gate technique. The hypermodularized vector pModCas2C was used to create two shuttle vectors in a single Golden Gate reaction, one containing the coding sequence for Cas9 and the other the sequence for Cas12a, in addition to a prototrophy marker for uracil and the 2 micra DNA replication origin of *Saccharomyces cerevisiae* (pCas9U2micra and pCas12U2micra vectors, respectively). To accelerate the prototyping and selection of pCas9U2micra, an *S. cerevisiae* transformation pipeline was developed, followed by multiplex-type *Escherichia coli* colony PCR. The application of this pipeline made it possible to obtain the pCas9U2micra vector quickly. However, the Golden Gate technique and the vector prototyping pipeline used in this project proved inefficient, opening space for future optimization of these techniques to obtain gene-editing vectors quickly and on a large scale.

Keywords: synthetic biology; modular vector; CRISPR-Cas; Golden Gate; industrial yeasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do funcionamento do sistema CRISPR-Cas do sistema imune adaptativo de procariotos.

Figura 2. Esquema das classificações de edição genética baseada em CRISPR-Cas.

Figura 3. A abstração em biologia sintética.

Figura 4. Esquema de duas das principais técnicas de concatenação de partes de DNA.

Figura 5. Mapas de restrição dos vetores bases do trabalho.

Figura 6. Diagrama esquemático resultante da geração do plasmídeo pModCas2C.

Figura 7. Mapa de restrição do vetor pModCas2C.

Figura 8. Validação dos potenciais vetores pModCas2C.

Figura 9. Mapa de restrição do vetor pCas9U2micra.

Figura 10. Esquema do procedimento de obtenção do vetor pCas9U2micra pela extração de biblioteca plasmideal.

Figura 11. Obtenção do vetor pCas9U2micra por biblioteca plasmideal.

Figura 12. Validação experimental do vetor pCas9U2micra.

Figura 13. Mapa de restrição do vetor pCas12U2micra.

Figura 14. Validação experimental do vetor pCas12U2micra.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas neste trabalho.

Tabela S1. Vetores utilizados neste trabalho.

Tabela S2. Oligonucleotídeos usados neste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

BioSin: Biologia Sintética

CRISPR: *Clustered and Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

crRNA: *CRISPR RNA*

DSB: *Double Strand Break* (quebra dupla de DNA)

gRNA: *guide RNA* (RNA guia)

MW: *Molecular Weight* (peso molecular)

PAM: *Protospacer Adjacent Motif* (motivo adjacente do protoespaçador)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

RPM: Rotações por Minuto

TALEN: *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (nucleases efetoras do tipo ativadores transcricionais)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. A edição de genomas utilizando a ferramenta CRISPR-Cas.....	15
1.2. A Biologia Sintética como fundamento para a geração de novas tecnologias.....	18
1.3. As técnicas de concatenação de partes de DNA.....	20
1.4. A aplicabilidade da edição gênica de microrganismos.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Procedimentos de bioinformática.....	25
4.1.1. Desenho in silico dos plasmídeos pModCas2C e pCas9U2micra.....	25
4.2. Procedimentos de microbiologia e de biologia molecular.....	28
4.2.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	28
4.2.2. Soluções e procedimentos básicos de biologia molecular.....	29
4.2.3. Reações em cadeia da polimerase (PCR) e técnica de clonagem por concatenação de fragmentos de DNA para obtenção do vetor pModCas2C.....	29
4.2.4. Procedimentos para transformação e isolamento de plasmídeos de <i>Escherichia coli</i>	29
4.2.5. Reações em cadeia da polimerase (PCR) e técnica de concatenação de fragmentos de DNA por Golden Gate para obtenção do vetor pCas9U2micra.....	30
4.2.6. Procedimentos para transformação e isolamento de plasmídeos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.2.7. Reações em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para confirmação do vetor pCas9U2micra.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Obtenção do vetor hipermodular pModCas2C.....	33
5.2. Obtenção e confirmação do vetor pCas9U2micra.....	35
5.3. Obtenção e confirmação do vetor pCas12U2micra.....	39
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. A edição de genomas utilizando a ferramenta CRISPR-Cas

A partir dos primeiros sequenciamentos de genomas inteiros de diferentes organismos e com o avanço constante da biotecnologia, novas metodologias para edição gênica surgiram. Com o uso de nucleases para geração de quebras em locais pré-determinados na fita dupla de DNA (DSB), ponto crucial para a correta edição de um genoma, houve o aumento da precisão da técnica, assim como da previsibilidade da mesma (CARROLL, 2017).

Inicialmente, a edição de genomas era baseada principalmente no uso de nucleases do tipo dedo de zinco, constituída de fatores transcricionais do tipo dedos de zinco fusionados ao sítio catalítico de endonucleases de restrição do tipo IIS, bem como efetores do tipo ativador transcricional (TALEN's), que é uma fusão entre a proteína TALE de *Xanthomonas* sp. e o sítio catalítico da endonuclease de restrição do tipo IIS *FokI* (VIEGAS, 2017). Entretanto, em 2013, a descoberta da ferramenta CRISPR-Cas (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas à proteína Cas), baseada no sistema imune adaptativo de procariontes, revolucionou este campo de pesquisas (PAUL; MONTOYA, 2020).

O sistema CRISPR-Cas encontra-se naturalmente no "sistema imune" de alguns procariontes, agindo na prevenção de infecções por fagos e transferências plasmidiais (**Figura 1**). Logo após um episódio de transferência genética horizontal, seja por fagos ou plasmídeos, pequenos fragmentos de DNA de reconhecimento exógeno são integrados neste conjunto de sequências denominado CRISPR, o que possibilita o hospedeiro a se proteger de futuras novas transferências causadas pelo mesmo invasor (JIANG; DOUDNA, 2017). Em um segundo episódio, o organismo já estará equipado com a maquinaria genética adequada para recrutar RNAs complementares à sequência CRISPR (crRNA) que, junto de nucleases do tipo Cas, agirão combatendo o material genético externo, clivando-o e inativando-o (**Figura 1**).

Atualmente, o sistema CRISPR-Cas é classificado em duas classes, sendo estas subdivididas em seis tipos (HILLE *et al.*, 2018). Enquanto os de classe I (tipos I, III e IV) envolvem um complexo que utiliza mais de uma proteína Cas em seu mecanismo, os de classe II (II, V e VI) necessitam apenas de uma proteína do mesmo tipo (LIU *et al.*, 2022). Dentre elas, duas são alvos recorrentes de estudos e aplicações práticas: a proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, sendo a primeira a ser desenvolvida para edição gênica e a mais utilizada para o mesmo fim, e a proteína Cas12a (também citada como Cpf1) de *Francisella novicida* que requer apenas um tipo de RNA como guia para a clivagem ocorrer

(PAUL; MONTOYA, 2020). Isso acontece pelo fato de que a Cas12a não necessita da maturação do intermediário tracrRNA para formação do crRNA, o RNA guia, como a Cas9, tendo um sistema dito simplificado e podendo ter melhor aplicação, em alguns casos, em comparação a outras proteínas (CHEN *et al.*, 2018).

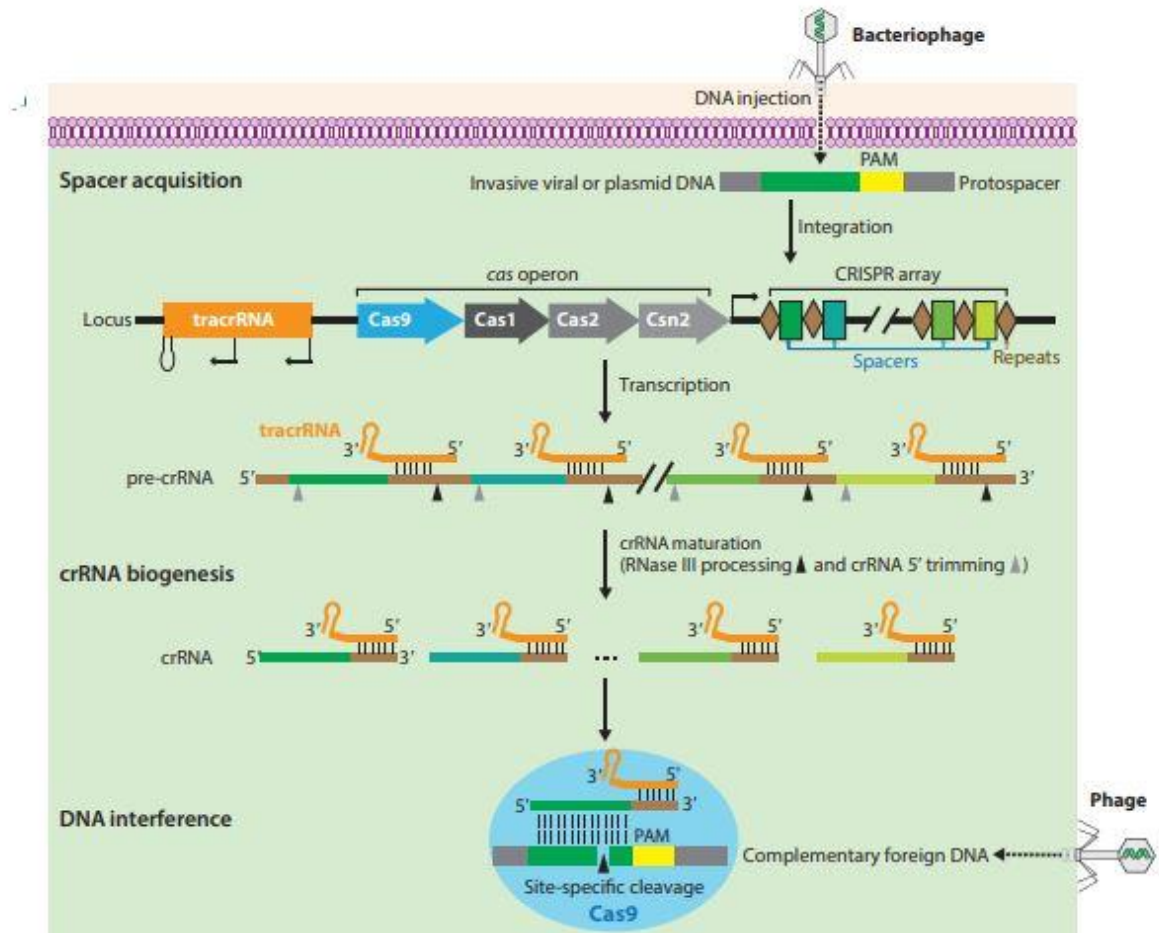


Figura 1. Esquema do funcionamento do sistema CRISPR-Cas do sistema imune adaptativo de procaríotos. O armazenamento de sequências repetitivas diminui as chances de novas infecções pelo mesmo agente, podendo ser utilizadas como guia para a clivagem por nucleases do material genético do agente infeccioso (adaptado de JIANG; DOUDNA, 2017).

A edição realizada pela nuclease Cas9, como exemplo, no sistema CRISPR, é mediada por uma molécula de RNA guia e, uma vez que esse complexo é formado, inicia-se uma varredura no DNA molde por sítios de complementaridade com os 20 nucleotídeos guia (**Figura 1**). Além disso, é necessária a presença de uma sequência de três nucleotídeos denominada de motivo adjacente do protoespaçador (PAM), que é essencial para a distinção entre o material genético do próprio complexo e do alvo, para que não ocorra autoclivagem (HILLE *et al.*, 2018). Após a ligação do gRNA ou crRNA no alvo correto, a nuclease é acionada provocando uma quebra dupla na fita de DNA, que será

reparada por recombinação homóloga, com a reparação precisa da clivagem por meio da presença de um DNA molde, ou por recombinação não homóloga, com a possível introdução de mutações do tipo inserções-deleções (indels) na sequência alvo (JIANG; DOUDNA, 2017).

Nos últimos anos, outras técnicas baseadas em CRISPR-Cas vem surgindo. As aplicações das técnicas podem ser divididas conforme a intenção do pesquisador em relação à edição gênica: conversão de par(es) de base, pela utilização de técnicas como *base editors*; deleção ou inserção de par(es) de base, utilizando técnicas como *prime editing*; e/ou um combinado destas alternativas, com o potencial uso de recombinases associadas à Cas (**Figura 2**) (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020). Além disso, as nickases, como são chamados os resultados de pequenas modificações na proteína Cas9 para a geração de quebras simples da fita de DNA, têm sido estudadas pela menor incidência de *off-targets* na edição gênica (TREVINO; ZHANG, 2014), pelo fato da não utilização da maquinaria de recombinação não homóloga na reparação das fitas de DNA (GAO *et al.*, 2017). Todas essas ferramentas são alvos de estudo da Biologia Sintética para seus aprimoramentos, pela criação de aparatos mínimos com partes de DNA sintéticos, além padronização destas partes utilizadas e ortogonalidade, aumentando a eficiência e previsibilidade da edição genética.

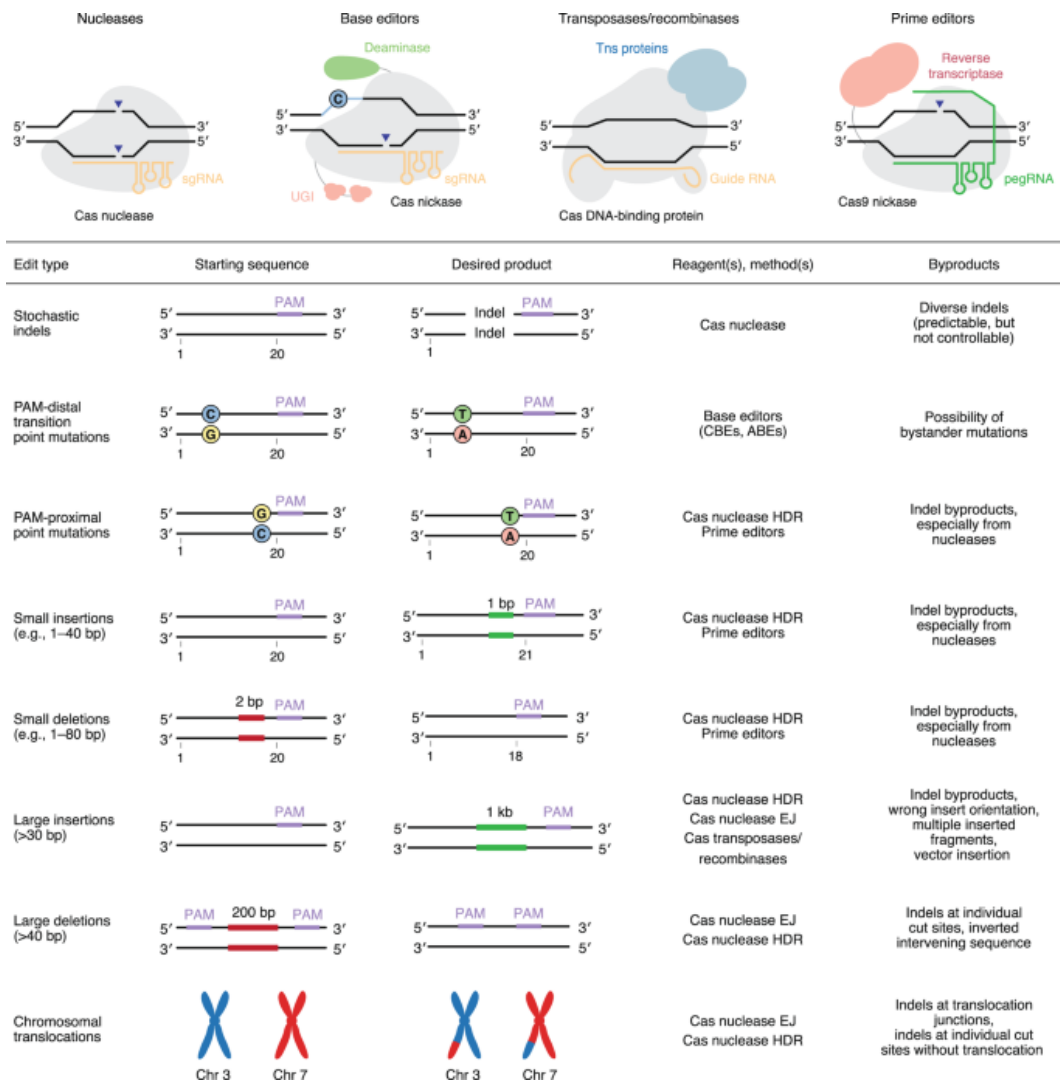


Figura 2. Esquema das classificações de edição genética baseada em CRISPR-Cas. As estratégias incluem agentes como nucleases, *base editors*, *prime editors* e transposases/recombinases (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020).

1.2. A Biologia Sintética como fundamento para a geração de novas tecnologias

A Biologia Sintética (BioSin) é uma área interdisciplinar que surge como uma consequência dos avanços de diferentes campos de pesquisas, incluindo a genômica e a bioinformática, onde se caracteriza pela construção e/ou reformulação de rotas metabólicas, aparatos biológicos e até organismos, com diferentes propósitos (LI *et al.*, 2021). A área traz um grande potencial na geração de novos produtos, tanto para aplicação científica, quanto industrial, e já é explorado para geração de novas fontes de energia (TSAI *et al.*, 2015), na indústria alimentícia (ALEXANDER *et al.*, 2016), na medicina (GURBATRI; ARPAIA; DANINO, 2022), entre outros.

Dois aspectos fundamentais diferem a Biologia Sintética da Engenharia Genética clássica: (i) a padronização das partes de DNA, onde se busca conhecer a funcionalidade e aplicabilidade de cada parte de DNA, seja este promotor, terminador e/ou sequências codificantes (entre outros) em diferentes contextos biológicos e (ii) a ortogonalidade, onde cada parte, dispositivo ou sistema de DNA atua de forma independente dos componentes celulares nativos do organismo, de forma que há pouca interferência dos componentes sintéticos na homeostasia celular (COSTELLO; BADRAN, 2021). Nesse sentido, a padronização e a ortogonalidade possibilitam que diferentes partes de DNA sejam combinadas seguindo um propósito biológico em mente que, por sua vez, dá origem a dispositivos de DNA (**Figura 3**). Por fim, a combinação de vários dispositivos dá origem a sistemas de DNA (ALDULIJAN *et al.*, 2023), caracterizando a chamada abstração em BioSin (**Figura 3**). A abstração possibilita a criação de genes até circuitos gênicos complexos baseados em lógica Booleana, com entradas e saídas biológicas determinadas (FEDERICI *et al.*, 2013), passando por genomas mínimos e/ou genoma sintéticos (MOL; KABRA; SINGH, 2018) (**Figura 3**).

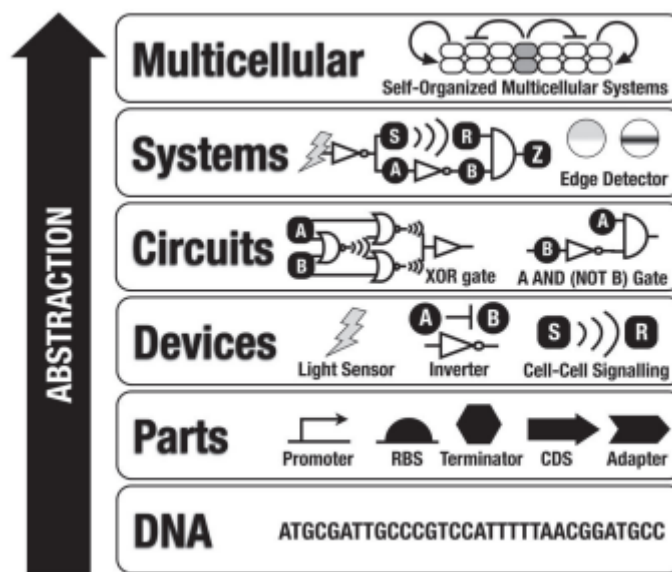


Figura 3. A abstração em biologia sintética. As sequências de DNA, de menor complexidade, definem as partes de DNA com funções definidas que, quando combinadas, dão origem a aparatos (*devices*) como, por exemplo, genes, que respondem a estímulos do ambiente gerando uma resposta. Esses aparatos, por sua vez, podem ser combinados em circuitos gênicos onde a combinação desses circuitos origina sistemas e, por fim, um organismo auto-organizado (adaptado de FEDERICI *et al.*, 2013).

Dessa forma, a aplicação da abstração, padronização e ortogonalidade na edição gênica por CRISPR-Cas proporciona a criação de caixas de ferramentas moleculares que

modularizam o uso de CRISPR-Cas, (XU; QI, 2019), facilitando experimentos, diminuindo o número de reações necessárias e otimizando protocolos nos diversos campos de estudo (HANCZYC, 2020). A modularização é, na essência, outro conceito importante de BioSin que difere da Engenharia Genética onde o intercâmbio de partes de DNA que compõem um dispositivo de DNA, tal como um plasmídeo, pode gerar de forma rápida e prática diferentes variantes do mesmo (ELLIS; ADIE; BALDWIN, 2011). Esse intercâmbio de partes promovido por diferentes tecnologias de concatenação de partes de DNA, aumenta as possibilidades de aplicação biológica do mesmo vetor, com a sua utilização em diferentes condições, permitindo o aumento da taxa de eficiência do mesmo. Ademais, a simplicidade de montagem desses vetores, com a utilização de técnicas de concatenação de fragmentos como a de Gibson (GIBSON *et al.*, 2009) e a de Golden Gate (LEE *et al.*, 2015) mais enzimas de restrição do tipo IIS, reafirma a vantagem do uso desse tipo de tecnologia dentro da biotecnologia.

1.3. As técnicas de concatenação de partes de DNA

A geração de novos vetores, ou o aprimoramento de um já existente, se dá pela concatenação das diversas partes de DNA conhecidas havendo, para isso, diversas técnicas como a de Gibson e a de Golden Gate (CASINI *et al.*, 2015). A primeira (**Figura 4, A**) se baseia na sobreposição de extremidades de fragmentos, fazendo uso de exonucleases (para gerar longas sequências sobreponíveis), DNA polimerase (para reconstituir as lacunas geradas na clivagem) e DNA ligase (para unir os fragmentos envolvidos) (GIBSON *et al.*, 2009). Já a segunda (**Figura 4, B**) se baseia no uso de enzimas de restrição do tipo IIS, onde apenas uma destas moléculas pode realizar inúmeras clivagens, gerando sobreposições curtas, sem deixar cicatrizes no vetor, e possibilitando a modularização das partes de DNA (HAMEDIRAD *et al.*, 2019).

Ambas as técnicas são amplamente utilizadas para clonagem atualmente, entretanto, ainda existe uma divergência entre os inúmeros protocolos da técnica de Golden Gate já publicados. Os contrastes se dão principalmente nas razões de volume vetor:insertos e na ciclagem de temperaturas às quais a reação será submetida. Mesmo com uma necessária padronização do método, a técnica ainda é uma das mais utilizadas e, após otimização, traz bons resultados às suas aplicações (CASINI *et al.*, 2015).

Outras técnicas *DNA-ligase free* podem ser utilizadas para o mesmo fim. A clonagem por polimerase de extensão circular (CPEC) faz uso de DNA polimerase, enzima comumente utilizada em técnicas de biologia molecular, para gerar regiões de homologia pela extensão da fita de DNA, gerando uma molécula circular de modo não custoso, fácil e preciso (QUAN; TIAN, 2009). A técnica de *In Vivo Assembly* (IVA) tem como base a utilização da via de recombinação homóloga independente da proteína recA para clonagem,

o que elimina a utilização de inúmeras enzimas e diminui o número de reações à uma (GARCÍA-NAFRÍA; WATSON; GREGER, 2016).

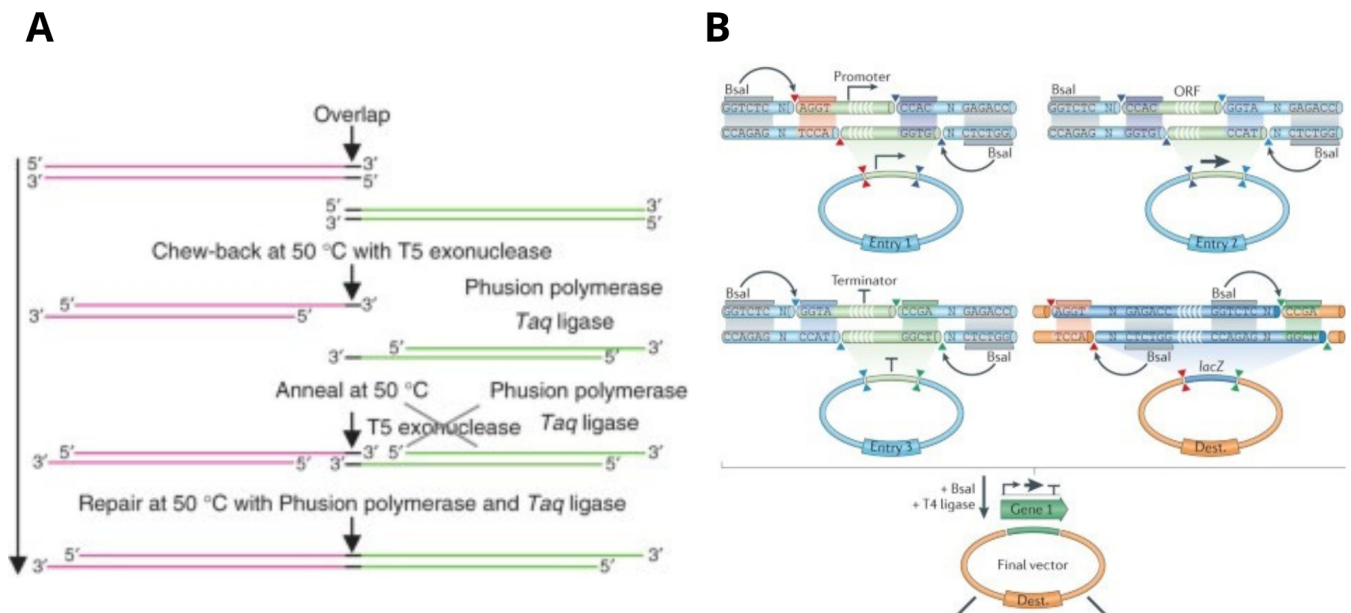


Figura 4. Esquema de duas das principais técnicas de concatenação de partes de DNA. Em (A) esquema da técnica de concatenação de Gibson, salientando as sobreposições de extremidades dos fragmentos (GIBSON *et al.*, 2009) e em (B) esquema da técnica de concatenação de múltiplos fragmentos de Golden Gate, com o uso da enzima de restrição do tipo IIS *BsaI* (adaptado de CASINI *et al.*, 2015).

1.4. A aplicabilidade da edição gênica de microrganismos

Com a popularização da técnica de CRISPR-Cas, muitos avanços puderam ser obtidos na geração de produtos biotecnológicos com base microbiológica, tendo eles aplicabilidade científica ou industrial (MORIO; LOMBARDI; BUTLER, 2020). Em conjunto da padronização das partes de DNA, ortogonalidade e modularidade proporcionada pela Biologia Sintética, há uma maior exatidão e precisão na obtenção do resultado esperado, visando tratamentos de patógenos humano e animais (LOMBARDI; BUTLER, 2022), geração de biocombustíveis (TSAI *et al.*, 2015), biofarmacêuticos e produtos naturais de interesse industrial (SÜNTAR *et al.*, 2021), entre outros.

Para que a edição gênica de leveduras seja realizada é comum que se utilize vetores bi-funcionais que possam ser replicados tanto em bactérias, especialmente *Escherichia coli*, quanto em leveduras. O uso de vetores bi-funcionais traz uma série de

vantagens, pois é possível replicar o vetor em quantidades suficientes em *E. coli* para posterior uso em leveduras (GNÜGGE; RUDOLF, 2017). Porém, a maioria dos vetores bi-funcionais usados para edição gênica são gerados pela concatenação de diferentes partes de DNA naturais, tais como como promotores e terminadores, deixando-os com um tamanho em pares de bases considerado grande (acima de 10 kb), encarecendo sua síntese, e/ou espécie-específicos, o que dificulta sua aplicação (WAGNER; ALPER, 2016). Contudo, os avanços em técnicas de desenho e obtenção de partes de DNA sintéticas possibilita a geração de dispositivos de expressão e, conseqüentemente, de vetores menores, o que diminui a complexidade de montagem de vetores, além de reduzir a indução de recombinação entre as partes de DNA empregadas com componentes do genoma do organismo (STAAL *et al.*, 2019).

Na área da saúde humana, a edição gênica de fungos colonizadores da microbiota humana, tanto para tratamento, quanto para prevenção de doenças, já é fonte de estudo. Foi retratado no trabalho de LI *et al.*, 2022 que há um enriquecimento de uma cepa oportunista de *Candida albicans* na microbiota intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal, apresentando alta capacidade de lesar células do cólon. Com a indução de mutações no gene *EFG1*, ligado à produção de filamentos por *C. albicans*, pela técnica de CRISPR-Cas9, observou-se, em modelo murino, uma redução da colonização desta cepa no intestino, e pode-se estudar as influências exercidas entre fatores fúngicos envolvidos no agravamento da doença.

O melhoramento de microrganismos de interesse industrial também é uma área de forte aplicação de tecnologias de edição gênica. No trabalho de LIU *et al.* foi demonstrado que a indução de mutações pela técnica de CRISPR-Cas em alvos específicos do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, como o fator de transcrição Spt15p, leva a uma diversidade de tolerância aumentada às condições de estresse celular, como alta pressão osmótica, temperatura e quantidade de etanol no meio, sendo esse último de interesse das indústrias de base fermentativa, como vitivinícola e cervejeira. O melhoramento da tolerância celular a diversos ambientes é importante para se que possa otimizar processos fabris, aumentando a produção e diminuindo os custos. Outros trabalhos mostram a deleção de genes inteiros de *S. cerevisiae* para o aumento da formação de compostos organossensoriais em maior escala, como ésteres (DANK; SMID; NOTEBAART, 2018). O melhoramento do metabolismo de levedura, como a maquinaria de recombinação, também foi implementado em *Pichia pastoris*, outra levedura modelo, por plataformas de edição genética, visando a melhoria da produção de proteínas heterólogas (CAI *et al.*, 2021).

A partir disso, o número de trabalhos envolvendo edição genética tende a crescer exponencialmente (MATHONY; HOFFMANN; NIOPEK, 2020), principalmente os que se utilizam da técnica de CRISPR-Cas. A BioSin se mostra como grande aliada na otimização

de cepas de microrganismos de interesse industrial, trazendo conceitos como ortogonalidade e padronização e a possibilidade da geração de vetores modularizados. Estes últimos flexibilizam a aplicação da edição gênica pela intercambialidade de suas partes de DNA, principalmente pelas técnicas de concatenação de Gibson e Golden Gate.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que a tecnologia CRISPR-Cas se mostra eficiente para a edição genética de diversos organismos, inclusive de leveduras, o interesse e fomento para sua utilização na geração de novos fenótipos cresce na área científica e industrial. Para isso, é imprescindível que se utilize ferramentas moleculares compatíveis com o genótipo a ser manipulado, sendo essas, de preferência, obtidas de maneira simples, no menor tempo possível. Sendo assim, o trabalho aqui descrito objetiva gerar um vetor base hipermodularizado que servirá de plataforma para a construção destas ferramentas moleculares, sendo possível combinar diversas partes de DNA, necessitando de apenas uma reação de concatenação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Gerar, por técnicas de biologia molecular, um vetor hipermodularizado para utilização da tecnologia CRISPR-Cas9/12a, possibilitando a edição genética de leveduras de interesse industrial.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver, *in vitro*, um plasmídeo hipermodularizado para a clonagem do tipo "one pot - one reaction" de uma origem de replicação para leveduras, de uma marca de seleção de transformantes de leveduras e uma sequência codificante para Cas9 ou Cas12a.
- Gerar, por diferentes técnicas de concatenação de partes de DNA, plasmídeos completos para edição gênica em leveduras.
- Estabelecer uma técnica de PCR multiplex capaz de detectar, simultaneamente, as três partes de DNA inseridas no vetor hipermodularizado pelas diferentes técnicas de concatenação empregadas.

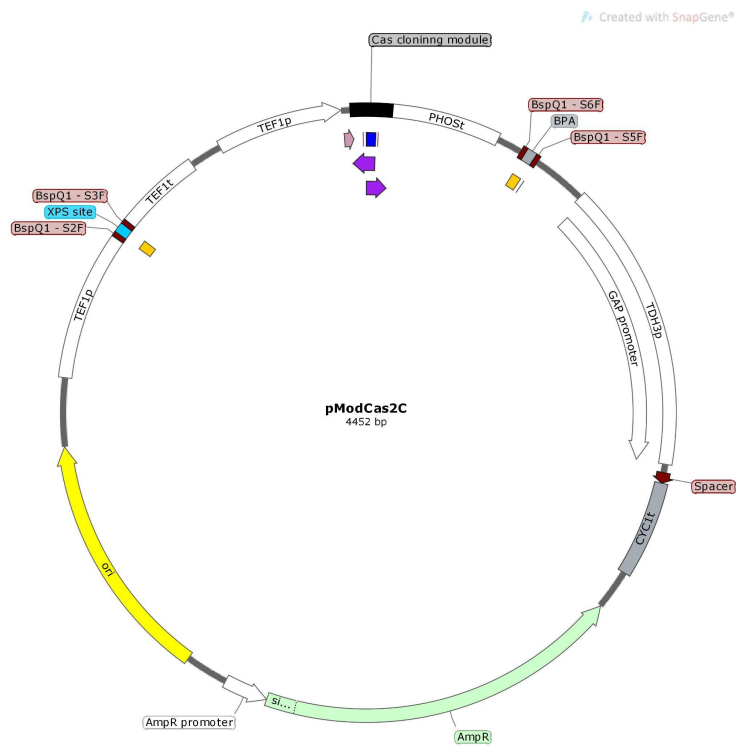
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Procedimentos de bioinformática

4.1.1. Desenho *in silico* dos plasmídeos pModCas2C e pCas9U2micra

As partes de DNA que constituem o plasmídeo pModCas2C (**Figura 5, A e Tabela S1**) são provenientes do vetor pUDP004 (**Figura 5, B e Tabela S1**) (GORTER DE VRIES *et al.*, 2017). Para tanto, o desenho do plasmídeo pModCas2C foi realizado *in silico* usando o procedimento de concatenação de fragmentos de DNA baseado na técnica Gibson (GIBSON *et al.*, 2009), que está implementada no programa SnapGene (<https://www.snapgene.com>). As sequências originais do vetor pUDP004 correspondentes a origem de replicação panARS_OPT, a sequência codificante para resistência a acetamida e a sequência codificante para Cas9 foram substituídas por três sequências sintéticas do tipo nulômeros (GEORGAKOPOULOS-SOARES *et al.*, 2021) não tóxicas e não codificantes de 24 pares de bases (pb) e que servem de ponto de sobreposição para a concatenação de fragmentos de DNA pela técnica de Gibson (**Figura 6**). Além disso, cada nulômero foi flanqueado por dois sítios de ligação para a enzima de restrição do tipo IIS *BspQI*, cada qual contendo uma sequência de corte diferente e que possibilita a ligação de fragmentos de DNA em uma ordem pré-determinada pela técnica de Golden Gate (LEE *et al.*, 2015). Desta forma, foram geradas três regiões habilitadas a receberem uma origem de replicação de leveduras, uma marca de seleção de transformantes para leveduras e uma sequência codificante para Cas9/Cas12 pela técnica de Golden Gate. Os oligonucleotídeos, contendo as respectivas regiões nuloméricas de sobreposição (**Tabela S2**) foram gerados *in silico* no programa SnapGene e posteriormente sintetizados em escala de 100 uM.

A



B

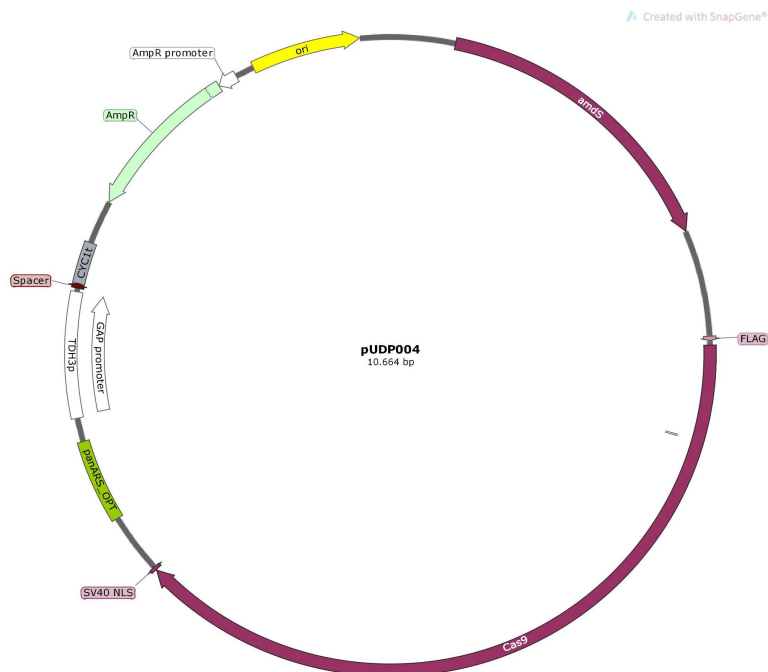


Figura 5. Mapas de restrição dos vetores bases do trabalho. Em (A) pModCas2C e em (B) pUDP004, o qual o vetor modularizado gerado neste trabalho tem suas partes de DNA baseadas.

4.2. Procedimentos de microbiologia e de biologia molecular

4.2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste projeto foram a BY4741 ou BY4742 (**Tabela 1**) (*EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis* - EUROSCARF; <http://www.euroscarf.de>). As cepas de leveduras foram cultivadas em meio completo YEPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de bacto-peptona e 20 g/L de glicose) para manutenção de rotina. Para o meio YEPD sólido foram adicionados 20 g/L de bacto-ágar. A seleção dos transformantes foi realizada em meio sintético sem uracila (Synco-ura) (100 g/L de YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos, 100 g/L de glicose, 100 g/L de sulfato de amônia e 8,3 g/L dos aminoácidos histidina, leucina e metionina). A cepa de *Escherichia coli* usada nesse projeto foi a NEB Stable Competent (**Tabela 1**) e foi cultivada em meio líquido LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl). Ao meio sólido e líquido, para seleção de transformantes, foi adicionada uma solução etanólica de ampicilina (100 mg/mL em etanol 70%) na concentração final de 100 µg/mL (meio LBA 1×).

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas neste trabalho.

Linhagem	Espécie	Genótipo	Referência
NEB Stable Competent	<i>Escherichia coli</i>	F' <i>proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zff::Tn10 (Tet^R)/Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e 14 - Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC</i>	New England Biolabs (catálogo número C3040H)
BY4741	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MATa <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF (catálogo número Y00000)
BY4742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MATα, <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF (catálogo número Y10000)

4.2.2. Soluções e procedimentos básicos de biologia molecular

Os procedimentos básicos para a manipulação de ácidos nucleicos (digestão com enzimas de restrição, análise e isolamento de fragmentos de DNA em géis de agarose, formulação de tampões, entre outros) foram realizados de acordo com os protocolos descritos no *Current Protocols in Molecular Biology* (<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19343647>).

4.2.3. Reações em cadeia da polimerase (PCR) e técnica de clonagem por concatenação de fragmentos de DNA para obtenção do vetor pModCas2C

As reações de PCR para a montagem do vetor pModCas2C a partir do pUDP004 (**Figura 5, B e Tabela S1**) foram realizadas utilizando o kit Q5® *High-Fidelity 2× Master Mix* (New England Biolabs, catálogo número M0492S), como segue: 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 µM (Synbio Technologies) e 1 µL de DNA. As reações finais foram de 25 µL completadas com água livre de nucleases (New England Biolabs). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA a 98 °C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98 °C por 30 s, um passo de anelamento a 60 °C por 10 s, um passo de extensão à 72 °C por 1 min e 5 s, seguido por um passo de extensão final à 72 °C por 2 min. Todas as partes de DNA geradas tiveram como molde o plasmídeo pUDP004 (**Tabela S1**).

Os fragmentos amplificados foram tratados com a enzima de restrição *DpnI* e purificados utilizando o kit *DNA Clean & Concentrator*®-25 (Zymo Research, catálogo número D4006). As amplificações purificadas foram concatenadas pela técnica de Gibson (GIBSON *et al.*, 2009), utilizando *NEBuilder*® *HiFi DNA Assembly Master Mix* (New England BioLabs, catálogo número E2621L), para geração do plasmídeo pModCas2C. Para a reação foram adicionados 10 µL de *NEBuilder*® *HiFi DNA Assembly Master Mix*, 2 µL de água livre de nucleases (New England Biolabs) e volumes variados de cada um dos quatro fragmentos purificados a serem concatenados, levando em consideração as concentrações, aferidas em espectrofotômetro. A reação foi incubada à 50 °C por 1 h.

4.2.4. Procedimentos para transformação e isolamento de plasmídeos de *Escherichia coli*

A cepa *E. coli* NEB Stable (**Tabela 1**) foi transformada com o vetor pModCas2C pelo método de choque térmico conforme especificações do fabricante. Foi aplicado 1 µL do vetor nas células competentes, que foram expostas a 42 °C por 30 s e, imediatamente, acondicionadas em gelo por 5 min. Após este período, foram adicionados 950 µL do meio

de recuperação NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium, e as células foram incubadas a 30 °C por 1 h, com leve agitação esporádica. Os potenciais transformantes foram semeados em meio LB com ampicilina 1× e foram incubados de 16 a 18 h em estufa a 37 °C.

As colônias transformadas crescidas na placa de petri foram inoculadas em tubos de ensaio estéreis com meio LBA 1× líquido, e incubados de 16 a 18 h a 37 °C, à 180 RPM em *shaker*. O vetor foi, então, isolado de dez inóculos de 5 mL com o uso do kit *Monarch Plasmid Miniprep* (New England Biolabs, catálogo número T1010S). As extrações tiveram, por fim, suas qualidades medidas por espectrofotometria usando absorbância a 260 nm (A260) e 280 nm (A280).

Além de medições biofísicas, o vetor isolado foi analisado por métodos de biologia molecular. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit *Q5® High-Fidelity 2× Master Mix* (New England Biolabs, catálogo número M0492S), seguindo indicações do fabricante, como segue: 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 µM (Synbio Technologies) e 1 µL de DNA. As reações finais foram de 25 µL completadas com água livre de nucleases (New England Biolabs). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA a 98 °C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98 °C por 30 s, um passo de anelamento a 60 °C por 10 s, um passo de extensão à 72 °C por 1 min e 5 s, seguido por um passo de extensão final à 72 °C por 2 min. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1× por 60 min a 60 V.

4.2.5. Reações em cadeia da polimerase (PCR) e técnica de concatenação de fragmentos de DNA por Golden Gate para obtenção do vetor pCas9U2micra

As partes de DNA a serem concatenadas no vetor pModCas2C para geração do vetor pCas9U2micra foram amplificadas pela técnica de PCR, tendo como molde três vetores distintos. O fragmento da proteína Cas9 é proveniente do vetor pUDP004 (**Tabela S1**), com a utilização dos oligonucleotídeos PCAS9-FOR e PCAS9-REV (**Tabela S2**), o fragmento de marca de seleção em levedura *KIURA3* é proveniente do vetor pUG72 (**Tabela S1**), com a utilização dos oligonucleotídeos PKIURA3B-FOR e PKIURA3B-REV (**Tabela S2**), e o fragmento de origem de replicação em levedura 2 micra é proveniente do vetor pRS42N (**Tabela S1**), com a utilização dos oligonucleotídeos P2MICRAB-FOR e P2MICRA-REV (**Tabela S2**).

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit *Q5® High-Fidelity 2× Master Mix* (New England Biolabs, catálogo número M0492S), seguindo indicações do fabricante, como segue: 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 µM (Synbio Technologies) e 1 µL de DNA. As

reações finais foram de 25 µL completadas com água livre de nucleases (New England Biolabs). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA à 98 °C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98 °C por 30 s, um passo de anelamento a 60 °C por 10 s, um passo de extensão à 72 °C por 1 min e 5 s, seguido por um passo de extensão final à 72 °C por 2 min. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1× por 60 min a 60 V.

A reação de Golden Gate utilizada foi adaptada de LEE *et al.* conforme descrito a seguir: 1 uL do vetor (20 fmol), 1 uL de cada inserto (20 fmol), 2 uL de T4 DNA ligase buffer (New England Biolabs), 1 uL T4 DNA ligase (New England Biolabs) e 1 uL da enzima de restrição *BspQI* (New England Biolabs). As reações finais foram de 20 µL completadas com água livre de nucleases (New England Biolabs). As condições do programa de ciclagem incluíram 25 ciclos de um passo de digestão do DNA à 42 °C por 2 min seguido de um passo de ligação a 16 °C por 5 min, finalizado por um passo de digestão a 60 °C por 10 min e um passo de inativação à 80 °C por 10 min.

4.2.6. Procedimentos para transformação e isolamento de plasmídeos de *Saccharomyces cerevisiae*

A cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 1**) foi transformada seguindo o protocolo descrito em GIETZ; SCHIESTL, 2007. Os potenciais transformantes foram semeados em placas de petri com meio sintético SynCo-ura sólido e foram incubados de 3 a 4 dias à 30 °C. As colônias crescidas foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio estéreis com 5 mL de meio SynCo-ura líquido cada, e incubados por 2 dias à 28 °C, à 180 RPM em *shaker*. O isolamento dos plasmídeos a partir dos inóculos foi feito com a utilização do kit *Yeast Plasmid Miniprep II* (Zymo Research, catálogo número D2004).

4.2.7. Reações em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para confirmação do vetor pCas9U2micra

Para a identificação dos insertos de interesse no vetor pCas9U2micra foram gerados oligonucleotídeos para utilização em PCR multiplex. As reações de PCR multiplex foram realizadas utilizando o kit *Q5® High-Fidelity 2× Master Mix* (New England Biolabs, catálogo número M0492S), seguindo indicações do fabricante, como segue: 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 µM (Synbio Technologies) e 1 µL de DNA. As reações finais foram de 25 µL completadas com água livre de nucleases (New England Biolabs). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA a 98 °C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98 °C por 10 s, um passo de anelamento a 60 °C

por 30 s, um passo de extensão à 72 °C por 8 s, seguido por um passo de extensão final à 72 °C por 2 min. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1× por 60 min a 60 V. Também foram realizadas reações de PCR de colônia multiplex, seguindo o mesmo protocolo citado acima, porém utilizando uma raspagem de colônia de *E. coli* ou *S. cerevisiae* como amostra de DNA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do vetor hipermodular pModCas2C

O vetor pModCas2C (**Figura 7**) tem como base o vetor pUDP004 (**Tabela S1**). Deste, foram amplificadas pela técnica de PCR as regiões que flanqueiam as partes correspondentes a origem de replicação panARS_OPT, a sequência codificante para resistência a acetamida e a sequência codificante para Cas9, sendo substituídas por nulômeros, cada qual com sítios para a enzima *BspQI* em suas extremidades (**Tabela S2**). As ampliações foram realizadas dessa maneira para que restasse, após a concatenação das partes pela técnica de Gibson, somente o *backbone* do vetor originário, sem a presença desses fragmentos, em tempo diminuído. Essa praticidade se dá pela menor quantidade de reações de clonagens necessárias para a montagem do vetor seguindo esse protocolo, sendo apenas uma reação necessária para a obtenção final do mesmo.

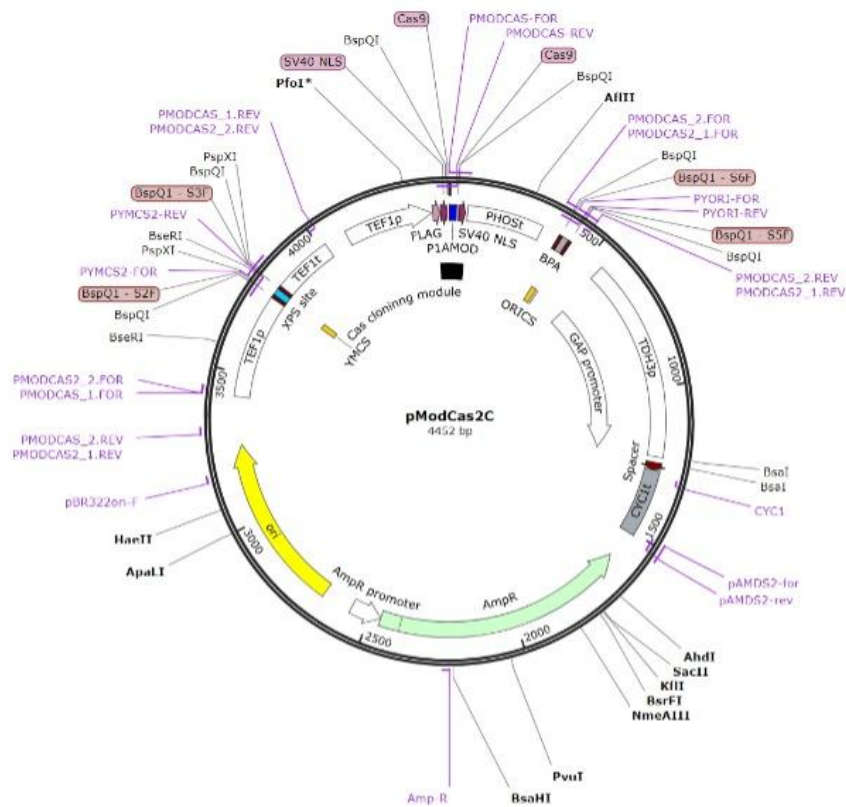


Figura 7. Mapa de restrição do vetor pModCas2C. O plasmídeo foi gerado neste trabalho pela técnica de Gibson, com sítios para enzima de restrição *BspQI* e *BsaI* para inserção de partes de DNA e de sequências de gRNA, respectivamente, pela técnica de Golden Gate.

A geração de um vetor menor e modular proporciona maior rapidez e eficiência na geração de novos vetores conforme a aplicação do mesmo. Pelo fato de uma única enzima de restrição flanquear os sítios de inserção de partes de DNA, a inserção de novos fragmentos pode ser realizada em apenas uma reação, diferente de outros trabalhos

publicados que se utilizam de vetores com enzimas diferentes por sítio (MADIKA *et al.*, 2022), necessitando, muitas vezes, de várias reações.

Após a concatenação das partes de DNA, foi realizada a transformação de *E. coli* conforme descrito no item 4.2.4 do tópico “Materiais e Métodos”. Foram feitos inóculos líquidos de cinco colônias de possíveis transformantes para a extração dos potenciais vetores. A análise da eletroforese em gel de agarose 1% (**Figura 8, B**) das reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos PYMCS2-FOR e PYORI-REV confirmaram todas as extrações, exibindo o padrão de banda similar ao simulado no software SnapGene (**Figura 8, A**).

O vetor pModCas2C pode gerar diferentes plasmídeos bifuncionais, uma vez que este confere resistência à ampicilina para seleção de bactérias e possui uma origem de replicação bacteriana derivada do vetor pUC18 (NORRANDER; KEMPE; MESSING, 1983). Além disso, a presença de sequências nuloméricas e sítios da enzima *BspQI* traz a possibilidade de inserção, pela técnica de Golden Gate (LEE *et al.*, 2015), de partes de DNA diversas correspondentes a origens de replicação em levedura, a sequências codificantes para marcas de resistência e a sequências codificantes para Cas9/Cas12. Pela mesma técnica, pode-se inserir gRNAs ou crRNAs no vetor com a utilização da enzima de restrição *BsaI*, para edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas.

O potencial de gerar vetores bifuncionais é importante tanto pela flexibilidade de uso em diferentes organismos distantes filogeneticamente, quanto pela possibilidade de gerar bibliotecas de sequências a serem filtradas pela maquinaria de expressão de outros organismos. Essas bibliotecas aumentam a probabilidade de se conseguir o vetor concatenado corretamente. O vetor modular gerado pelo trabalho de GEDDES *et al.* traz a construção de plasmídeos pela técnica de concatenação de Golden Gate exclusivamente para uso em bactérias. Os vetores criados pelo grupo de pesquisa são resultantes da concatenação de partes de DNA existentes em uma biblioteca de partes. Origens de replicação, marcas de seleção, sítios de clonagem e outros fragmentos podem ser acoplados entre si, sem a necessidade de concatenação em um vetor prévio. Diferentemente, os vetores aqui gerados são provenientes de inserções de partes de DNA em um vetor base, pModCas2C, pela existência de outras partes de DNA de expressão tanto para bactérias, quanto para leveduras, o que aumenta o número de partes necessárias na sua montagem.

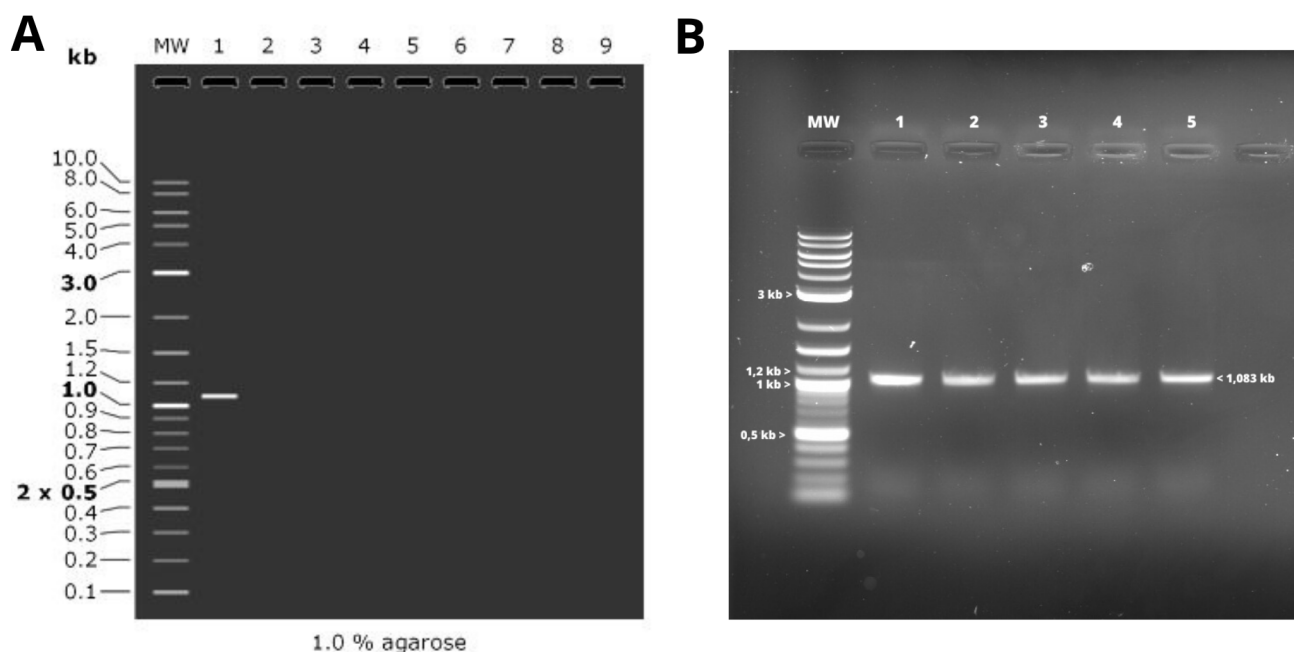


Figura 8. Validação dos potenciais vetores pModCas2C. Em (A) simulação, em gel de agarose 1%, do padrão de bandas da reação de PCR confirmatória da geração do vetor pModCas2C (canaleta 1). Em (B), análise da eletroforese em gel de agarose 1% confirmando o vetor pModCas2C (canaletas 1-5). Para as reações de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos PYMCS2-FOR e PYORI-REV (Tabela S2). As amplificações têm tamanho de banda esperado de 1,083 kb. Legenda: marcador de peso molecular (MW), em kilobases (kb).

5.2. Obtenção e confirmação do vetor pCas9U2micra

Após a geração do vetor pModCas2C, e usufruindo da capacidade de modularização de partes do mesmo, foi iniciada a montagem de plasmídeos bifuncionais para edição gênica em leveduras. Para isso, foi escolhida a origem de replicação epissomal em levedura *2 micra*, de *S. cerevisiae*, e as sequências codificantes da marca de seleção *KIURA3*, de *Kluyveromyces lactis*, que confere prototrofia para uracila em cepas de *S. cerevisiae*, e da proteína Cas9, de *Streptococcus pyogenes*. As partes de DNA foram concatenadas pela técnica de Golden Gate com a utilização da enzima de restrição do tipo IIS *BspQI*.

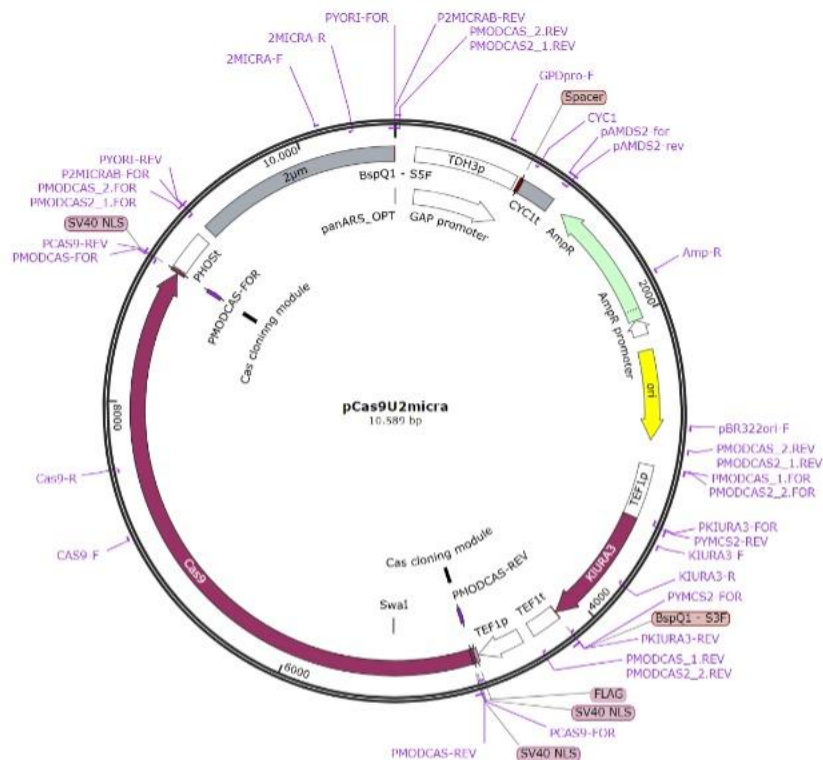


Figura 9. Mapa de restrição do vetor pCas9U2micra. O plasmídeo foi gerado neste trabalho pela técnica de Golden Gate, com a inserção das partes de DNA de Cas9, da marca de seleção *KIURA3* e da origem de replicação em levedura 2 micra.

O DNA que dá origem à origem de replicação 2 micra é extracromossômico de cópias múltiplas em que cada molécula se replica em cada ciclo celular (ZAKIAN; BREWER; FANGMAN, 1979). Essa característica é importante para que o gene de interesse tenha alta expressão, potencialmente produzindo grande quantidade da proteína associada (LI *et al.*, 2020). Já a expressão do gene *URA3*, pela introdução da sequência codificante do mesmo no vetor pCas9U2micra, em cepas que apresentam auxotrofia à base nitrogenada uracila, é amplamente utilizado como forma de seleção de transformantes em leveduras, *Aspergillus*, *C. orbiculare*, entre outros (YONEHARA *et al.*, 2023). A utilização de meios seletivos por auxotrofia é uma boa alternativa ao uso de antibióticos e/ou fungicida pelo fato de que estes potencialmente interferem nas rotas metabólicas do gene alvo, além de serem mais caros (CALCÁNEO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Para maior probabilidade de se obter o vetor correto em maior quantidade, a reação foi utilizada para a transformação de *E. coli*. Após crescimento de colônias na placa de petri, as mesmas foram ressuspensas em água destilada estéril e do volume resultante foi extraída uma biblioteca de vetores potenciais (**Figura 10**). Essa biblioteca foi utilizada para transformar a cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, que funciona como uma espécie de filtro para o vetor pCas9U2micra (**Figura 9**) pelo fato de que duas das três partes DNA concatenadas

neste novo vetor (2 micra e *KIURA3*) são necessárias para o desenvolvimento da levedura no meio seletivo utilizado.

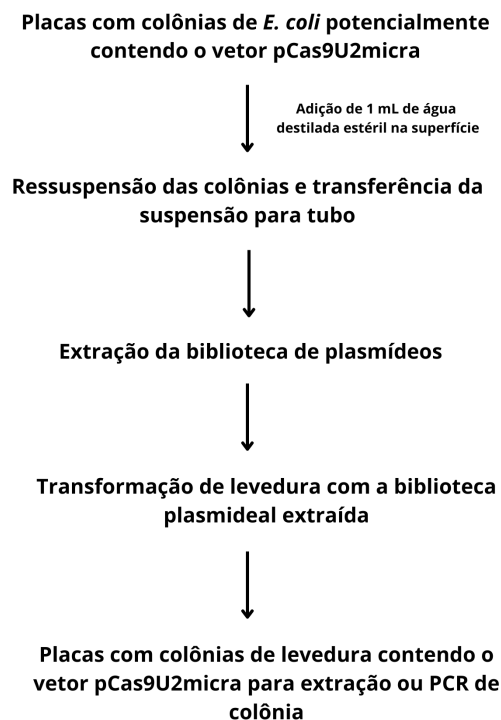


Figura 10. Esquema do procedimento de obtenção do vetor pCas9U2micra pela extração de biblioteca plasmideal. Esse sistema aumenta a probabilidade de se obter o vetor correto, em maior quantidade, principalmente quando a eficácia do método de concatenação é baixa.

Em quatro dias, quatro colônias de BY4741 com os possíveis vetores podiam ser observadas na placa de petri (**Figura 11, A**). As análises realizadas pela técnica de PCR de colônia multiplex mostraram que duas das quatro colônias continham o vetor pCas9U2micra correto (**figura 11, B**), com a concatenação dos três fragmentos; entretanto, nas outras duas colônias a concatenação foi incompleta, havendo somente a inserção dos fragmentos 2 micra e *KIURA3* (**figura 11, B**). Isso pode ser atribuído à baixa eficiência do protocolo de Golden Gate utilizado, ainda sob otimização no laboratório, e do protocolo de transformação de leveduras adotado.

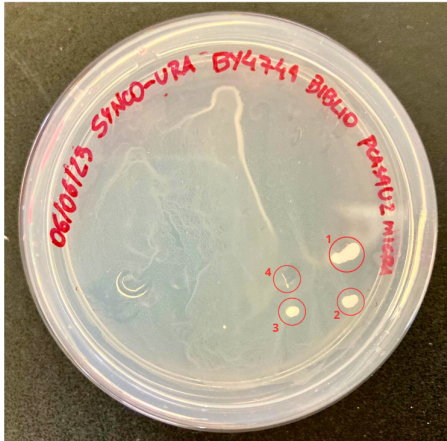
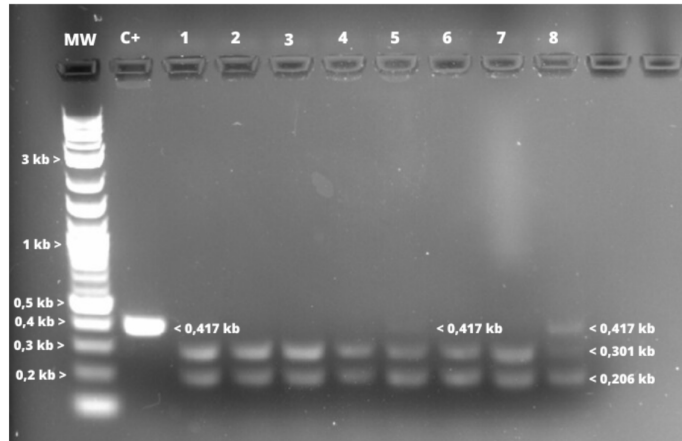
A**B**

Figura 11. Obtenção do vetor pCas9U2micra por biblioteca plasmideal. Em (A) imagem da placa de petri com colônias da levedura BY4741 com o potencial vetor pCas9U2micra, provenientes de transformação com biblioteca plasmideal. Em (B) análise de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) do produto de PCR de colônia multiplex para os fragmentos Cas9, *KIURA3* e 2 micra das colônias presentes na placa de petri da transformação de levedura com biblioteca plasmideal (canaletas 5-8). Controle positivo (C+) é referente a amplificação do fragmento Cas9 do vetor pUDP004. Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

Os vetores foram extraídos das quatro colônias e a presença ou ausência de cada parte de DNA nos mesmos foi analisada separadamente pela técnica de PCR (**Figura 12, B**). Novamente, pode-se identificar os três insertos, com padrão de bandas similar ao simulado no software Snapgene (**Figura 12, A**), somente nos vetores extraídos das mesmas duas colônias já identificadas posteriormente por PCR de colônia multiplex. A extração dos vetores foi realizada em todas as colônias, mesmo após a não obtenção das ampliações confirmatórias em duas delas no PCR de colônia multiplex, pois essa última técnica ainda apresenta imprecisões e deve ser otimizada.

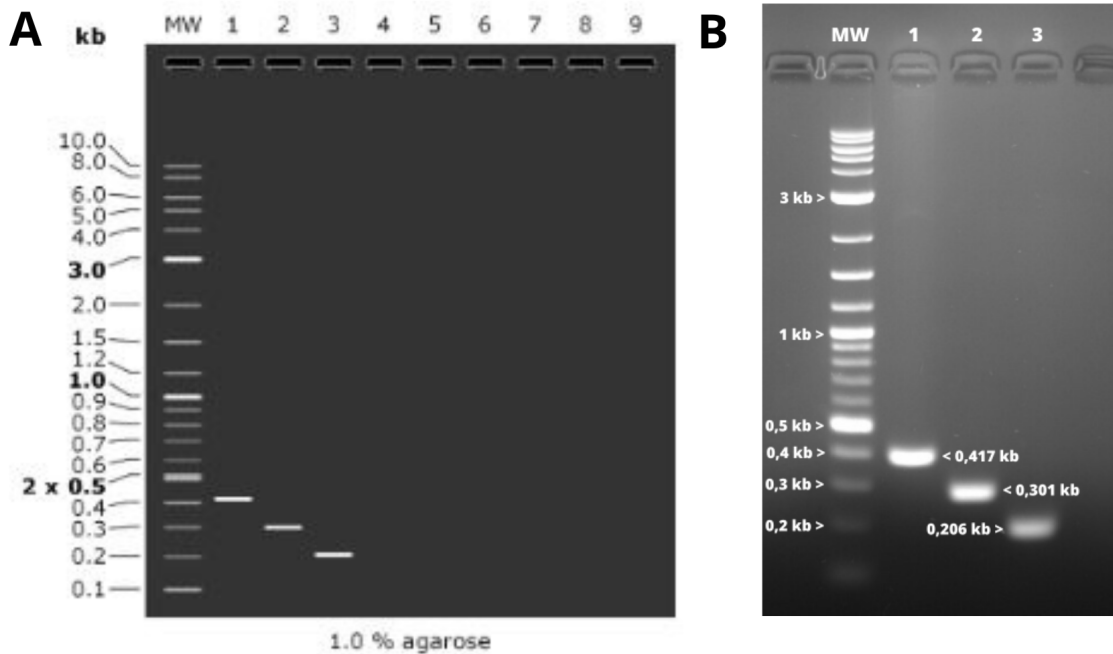


Figura 12. Validação experimental do vetor pCas9U2micra. Em (A) simulação em gel de agarose 1% (p/v) do padrão de amplificação de Cas9, com fragmento esperado de 0,417 kb (canaleta 1), *KIURA3*, com fragmento esperado de 0,301 kb (canaleta 2) e 2micra, com fragmento esperado de 0,206 kb (canaleta 3). Em (B) análise de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR dos fragmentos Cas9 (canaleta 1), *KIURA3* (canaleta 2) e 2 micra (canaleta 3). Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

5.3. Obtenção e confirmação do vetor pCas12U2micra

O processo de montagem do vetor pCas12U2micra (**Figura 13**) foi realizado em colaboração com a graduanda do Curso de Biotecnologia da UFRGS Isabelli Seiler, e foi realizado do mesmo modo que a de pCas9U2micra com a diferença na escolha da sequência codificante para a Cas12 de *Lachnospiraceae bacterium* (LbCas12a). Esta, pode ser uma melhor escolha para edição genética em organismos com genomas ricos em adenina e/ou timina, pelo fato de que o sítio PAM de reconhecimento da enzima LbCas12a é rico em timinas (5' TTTV) (BAO; DE DIOS MATEOS; SCHELLER, 2022). A modularização do vetor permite que se obtenham modificações das partes de DNA para gerar plasmídeos personalizados à realidade do pesquisador, tanto em questão de disponibilidade de insumos do laboratório, quanto à aplicação biológica do vetor.

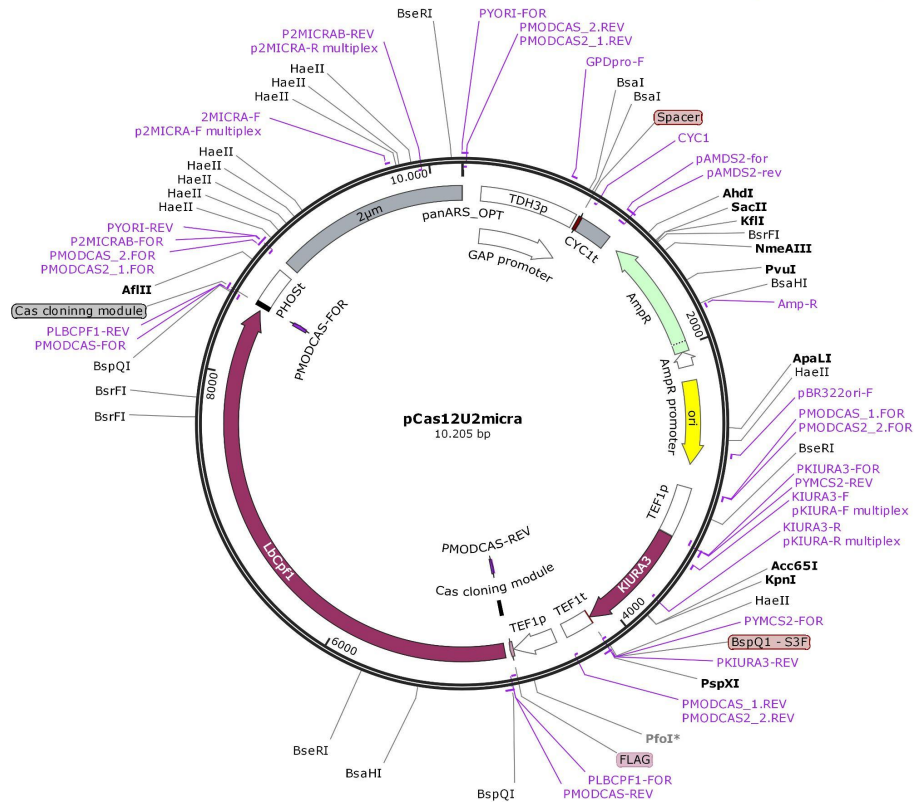


Figura 13. Mapa de restrição do vetor pCas12U2micra. O plasmídeo foi gerado neste trabalho pela técnica de Golden Gate, com a inserção das partes de DNA de Cas12, da marca de seleção *KIURA3* e da origem de replicação em levedura 2 micra.

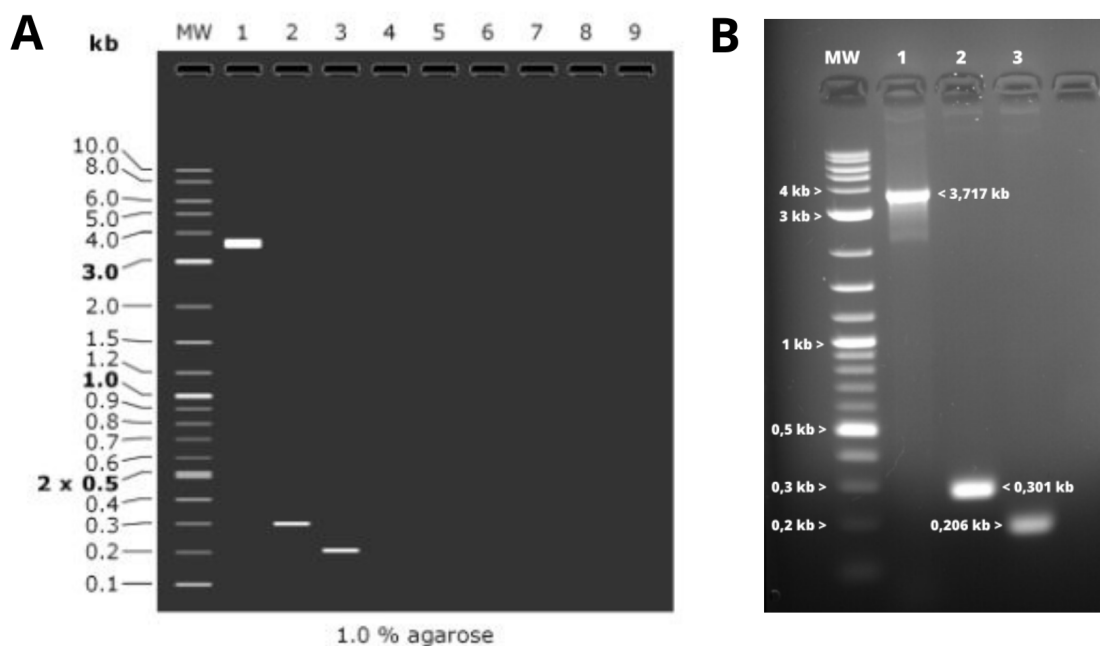


Figura 14. Validação experimental do vetor pCas12U2micra. Em (A) simulação em gel de agarose 1% (p/v) do padrão de amplificação de Cas12, com fragmento esperado de 3,717

kb (canaleta 1), *KIURA3*, com fragmento esperado de 0,301 kb (canaleta 2) e 2 micra, com fragmento esperado de 0,206 kb (canaleta 3). Em (B) análise de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR dos fragmentos Cas12 (canaleta 1), *KIURA3* (canaleta 2) e 2 micra (canaleta 3). Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

Cinco colônias resultantes da transformação de *E. coli* com a reação de Golden Gate foram escolhidas aleatoriamente para serem testadas, por PCR de colônia, para a presença do inserto de Cas12a. A escolha deste fragmento se deu pela maior dificuldade de concatenação do mesmo, pelo maior tamanho em comparação aos demais. Dentre as amostras, uma apresentava o fragmento analisado.

A análise da amostra positiva foi, então, ampliada para os outros dois fragmentos, que foram confirmados por PCR após extração do possível vetor da colônia alvo (**figura 14, B**).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados gerados através deste trabalho possibilitaram a geração de um vetor hipermodularizado, com sítios para inserção de partes de DNA que compreendam diferentes origens de replicação de levedura, sequências codificantes de proteínas do tipo Cas e de marcas de seleção pela técnica de Golden Gate. Os vetores bifuncionais gerados a partir deste poderão ser utilizados na técnica de CRISPR-Cas, pela inserção de uma sequência de gRNA, para edição gênica.

Subsequentemente, como teste visual da eficácia da edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas pelo uso dos vetores gerados neste trabalho, pretende-se utilizar um gRNA para clivagem do gene *ADE2* de *Saccharomyces cerevisiae*. A proteína codificada por este gene está envolvida na via da biossíntese de adenina (GEDVILAITE; SASNAUSKAS, 1994) que, uma vez interrompida pela edição, gerará um intermediário metabólico de cor vermelha que se acumula no vacúolo da levedura. Essa coloração é visualmente perceptível nas colônias de levedura editadas, sendo um método rápido e preciso de confirmação da técnica.

Além disso, pretende-se realizar a otimização da técnica de Golden Gate, para aumento da eficácia da geração de novos vetores provenientes do pModCas2C, assim como a otimização da técnica de PCR multiplex, principalmente para partes de DNA maiores, como a de proteínas Cas. Este último trará maior agilidade na confirmação molecular da concatenação correta das partes.

Por fim, os promotores e terminadores naturais presentes no vetor pModCas2C usados para a expressão da marca de seleção de transformante e de Cas9/Cas12a serão trocados por versões sintéticas, possibilitando reduzir consideravelmente o tamanho do vetor e aumentando a eficiência de clonagem de partes de DNA por diferentes técnicas de concatenação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDULIJAN, Ibrahim *et al.* Functional Synthetic Biology. **Synthetic Biology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. ysad006, 2023.

ALEXANDER, William G. *et al.* Efficient engineering of marker-free synthetic allotetraploids of *Saccharomyces*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, [s. l.], v. 89, p. 10–17, 2016.

ANZALONE, Andrew V.; KOBLAN, Luke W.; LIU, David R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 824–844, 2020.

BAO, Jichen; DE DIOS MATEOS, Enrique; SCHELLER, Silvan. Efficient CRISPR/Cas12a-Based Genome-Editing Toolbox for Metabolic Engineering in *Methanococcus maripaludis*. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 2496–2503, 2022.

CAI, Peng *et al.* Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. 13, p. 7791–7805, 2021.

CALCÁNEO-HERNÁNDEZ, Gabriela *et al.* An efficient transformation system for *Trichoderma atroviride* using the *pyr4* gene as a selectable marker. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 1631–1643, 2020.

CARROLL, Dana. Genome Editing: Past, Present, and Future. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 653–659, 2017.

CASINI, Arturo *et al.* Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 568–576, 2015.

CHEN, Janice S. *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 360, n. 6387, p. 436–439, 2018.

COSTELLO, Alan; BADRAN, Ahmed H. Synthetic Biological Circuits Within an Orthogonal Central Dogma. **Trends in biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 59–71, 2021.

DANK, Alexander; SMID, Eddy J.; NOTEBAART, Richard A. CRISPR-Cas genome engineering of esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae* steers aroma formation. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 682, 2018.

ELLIS, Tom; ADIE, Tom; BALDWIN, Geoff S. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. **Integrative Biology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 109–118, 2011.

FEDERICI, Fernán *et al.* Synthetic Biology: opportunities for Chilean bioindustry and education. **Biological Research**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 383–393, 2013.

GAO, Yuanpeng *et al.* Single Cas9 nickase induced generation of *NRAMP1* knockin cattle with reduced off-target effects. **Genome Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 13, 2017.

GARCÍA-NAFRÍA, Javier; WATSON, Jake F.; GREGER, Ingo H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 27459, 2016.

GEDDES, Barney A.; MENDOZA-SUÁREZ, Marcela A.; POOLE, Philip S. A Bacterial Expression Vector Archive (BEVA) for Flexible Modular Assembly of Golden Gate-Compatible Vectors. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 3345, 2019.

- GEDVILAITE, A.; SASNAUSKAS, K. Control of the expression of the *ADE2* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 475–479, 1994.
- GEORGAKOPOULOS-SOARES, Ilias *et al.* Absent from DNA and protein: genomic characterization of nullomers and nullpeptides across functional categories and evolution. **Genome Biology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 245, 2021.
- GIBSON, Daniel G *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009.
- GIETZ, R Daniel; SCHIESTL, Robert H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 31–34, 2007.
- GNÜGGE, Robert; RUDOLF, Fabian. *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle vectors: Yeast Vectors. **Yeast**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 205–221, 2017.
- GORTER DE VRIES, Arthur R. *et al.* CRISPR-Cas9 mediated gene deletions in lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 222, 2017.
- GUELDERER, U. *et al.* A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. e23, 2002.
- GURBATRI, Candice R.; ARPAIA, Nicholas; DANINO, Tal. Engineering bacteria as interactive cancer therapies. **Science**, [s. l.], v. 378, n. 6622, p. 858–864, 2022.
- HAMEDIRAD, Mohammad *et al.* Highly Efficient Single-Pot Scarless Golden Gate Assembly. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1047–1054, 2019.
- HANCZYC, Martin M. Engineering Life: A Review of Synthetic Biology. **Artificial Life**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 260–273, 2020.
- HILLE, Frank *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, [s. l.], v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 2018.
- JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 505–529, 2017.
- LEE, Michael E. *et al.* A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 975–986, 2015.
- LI, Jing *et al.* Advances in Synthetic Biology and Biosafety Governance. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, p. 598087, 2021.
- LI, Xin V. *et al.* Immune regulation by fungal strain diversity in Inflammatory Bowel Disease. **Nature**, [s. l.], v. 603, n. 7902, p. 672–678, 2022.
- LI, Ding *et al.* Optimized expression of classical swine fever virus E2 protein via combined strategy in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 167, p. 105527, 2020.
- LIU, Yanfang *et al.* Stress tolerance enhancement via SPT15 base editing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 14, p. 155, 2021.
- LIU, Guanwen *et al.* The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 333–347, 2022.
- LOMBARDI, Lisa; BUTLER, Geraldine. Plasmid-Based CRISPR-Cas9 Editing in Multiple *Candida* Species. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2542, p. 13–40,

2022.

MADIKA, Abubakar *et al.* pMTL60000: A modular plasmid vector series for *Parageobacillus thermoglucosidasius* strain engineering. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 202, p. 106600, 2022.

MATHONY, Jan; HOFFMANN, Mareike D.; NIOPEK, Dominik. Optogenetics and CRISPR: A New Relationship Built to Last. *Em*: NIOPEK, Dominik (org.). **Photoswitching Proteins : Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. (Methods in Molecular Biology). p. 261–281. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0755-8_18. Acesso em: 5 ago. 2023.

MOL, Milsee; KABRA, Ritika; SINGH, Shailza. Genome modularity and synthetic biology: Engineering systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 132, p. 43–51, 2018.

MORIO, Florent; LOMBARDI, Lisa; BUTLER, Geraldine. The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. e1008201, 2020.

NORRANDER, Jan; KEMPE, Tomas; MESSING, Joachim. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. **Gene**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 101–106, 1983.

PAUL, Bijoya; MONTOYA, Guillermo. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. **Biomedical Journal**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 8–17, 2020.

QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. e6441, 2009.

STAAL, Jens *et al.* Engineering a minimal cloning vector from a pUC18 plasmid backbone with an extended multiple cloning site. **BioTechniques**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 254–259, 2019.

SÜNTAR, Ipek *et al.* Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: Biotechnological aspects. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 50, p. 107768, 2021.

TAXIS, Christof; KNOP, Michael. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. **BioTechniques**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 73–78, 2006.

TREVINO, Alexandro E.; ZHANG, Feng. Chapter Eight - Genome Editing Using Cas9 Nickases. *Em*: DOUDNA, Jennifer A.; SONTHEIMER, Erik J. (org.). **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Academic Press, 2014. (The Use of CRISPR/Cas9, ZFNs, and TALENs in Generating Site-Specific Genome Alterations). v. 546, p. 161–174. *E-book*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128011850000088>. Acesso em: 12 ago. 2023.

TSAI, Ching-Sung *et al.* Yeast synthetic biology toolbox and applications for biofuel production. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–15, 2015.

VERWAAL, René *et al.* CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 201–211, 2018.

VIEGAS, Ana Carolina. AS CARACTERÍSTICAS DOS MECANISMOS E SISTEMAS DE EDIÇÃO GENÔMICA. [s. l.], 2017.

WAGNER, James M.; ALPER, Hal S. Synthetic biology and molecular genetics in

non-conventional yeasts: Current tools and future advances. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 89, p. 126–136, 2016.

XU, Xiaoshu; QI, Lei S. A CRISPR–dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 431, n. 1, CRISPR: from the basic biology to its technological applications, p. 34–47, 2019.

YONEHARA, Katsuma *et al.* Efficient multiple gene knockout in *Colletotrichum higginsianum* via CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein and *URA3*-based marker recycling. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mpp.13378>. Acesso em: 13 ago. 2023.

ZAKIAN, Virginia A.; BREWER, Bonita J.; FANGMAN, Walton L. Replication of each copy of the yeast 2 micron DNA plasmid occurs during the S phase. **Cell**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 923–934, 1979.

ANEXOS

Tabela S1. Vetores utilizados neste trabalho.

Nome	Descrição	Fonte	ID	Repositório
pUDP004	Vetor bifuncional <i>E. coli-S.cerevisiae</i> contendo a sequência codificante para <i>Cas9</i> e um aparato de expressão de gRNAs em leveduras, além de sequência de replicação autônoma (ARS).	GORTER DE VRIES <i>et al.</i> , 2017	101165	Addgene
pCSN067	Vetor de cópia única contendo a sequência de <i>Cpf1</i> de <i>Lachnospiraceae bacterium ND2006</i> , otimizado para expressão em <i>S. cerevisiae</i> .	VERWAAL <i>et al.</i> , 2018	101748	Addgene
pCSN068	Vetor de cópia única contendo a sequência de <i>Cpf1</i> de <i>Francisella novicida U112</i> , otimizado para expressão em <i>S. cerevisiae</i> .	VERWAAL <i>et al.</i> , 2018	101749	Addgene
pUG72	Vetor contendo sequência do gene <i>KIURA3</i> , de <i>Kluyveromyces lactis</i> , que confere prototrofia para uracila em cepas de <i>S. cerevisiae</i> .	GUELDENER <i>et al.</i> , 2002	P30117	EUROSCARF
pRS42N	Vetor contendo sequência para a origem de replicação em levedura 2 micra.	TAXIS; KNOP, 2006	P30638	EUROSCARF
pRS42H	Vetor contendo sequência para a marca de seleção para higromicina.	TAXIS; KNOP, 2006	P30636	EUROSCARF
pModCas2C	Vetor base hipermodularizado para a construção de ferramentas moleculares baseadas em CRISPR-Cas9/Cas12a para leveduras.	Este estudo		
pCas9U2micra	Vetor com base em pModCas2C contendo a sequência codificante para <i>KIURA3</i> , 2 micra e <i>Cas9</i> .	Este estudo		
pCas12U2micra	Vetor com base em pModCas2C contendo a sequência codificante para <i>KIURA3</i> , 2 micra e <i>Cas12a</i> .	Este estudo		

Tabela S2. Oligonucleotídeos usados neste trabalho.

Nome	Sequência	Propósito
PMODCAS-FOR	GCAAGAGAGAGTTCCACCAGAACAGCT CTTCCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGT CTGAGCGG	Geração do vetor pModCas2C
PMODCAS-REV	TGTTCTGGTGGAACTCTCTTTGCTGCT CTTCGACTTTCTCTTTTGGAGG TTTGTC	Geração do vetor pModCas2C
PYORI-FOR	GGGCCCGAGGATATCCTCGGATCCGCT CTTCCAGAACGTCTCACGGATCGTATAT GCCGTAGC	Geração do vetor pModCas2C
PYORI-REV	GGATCCGAGGATATCCTCGGGCCCGCT CTTCTGTGTGCCGAACCTTCCCTGTATG AAGCGAT	Geração do vetor pModCas2C
PYMCS2-FOR	CTCGAGGAGGATATCCTCGTGCACGCT CTTCACTAGCTCGAGGACAATAAAAAGA TTCTTGTTTTCAAGAA	Geração do vetor pModCas2C
PYMCS2-REV	GTCGACGAGGATATCCTCCTCGAGGCT CTTCGCAACGGATCCTTGTATGTTTCG GATGTGATGTGAGAA	Geração do vetor pModCas2C
PAMDS2-FOR	GCTTGAGAAGGTTTTGGACCGATTATC AAAAAGGATCTTACCTAGATCCT	Geração do vetor pModCas2C
PAMDS2-REV	AAGATCCTTTTTGATAATCGGTCCCAA AACCTTCTCAAGCAAG	Geração do vetor pModCas2C
PCAS9B-FOR	GACTTGGCTCTTCAGGTCGATAAGAAAT ACTCAATAGGCTTAGATATCGGCAC	Amplificação de <i>Cas9</i>
PCAS9B-REV	GATCCAGCTCTTCGGAGGGTCACCTCC TAGCTGACTCAAATCAA	Amplificação de <i>Cas9</i>
PFNCPF1B-FOR	GACTTGGCTCTTCAGGTCAGTATCTACC AAGAGTTTGTCAACAAATACTCTTTGT	Amplificação de <i>Cas12a</i>
PFNCPF1B-REV	GATCCAGCTCTTCGGAGGAGCTCTGGA GTTGTTTCTGTTTTGAAC	Amplificação de <i>Cas12a</i>
PKIURA3B-FOR	GACTTGGCTCTTCGTTGCATGTCCACAA AATCATATACCAGTAGAGCT	Amplificação de <i>KIURA3</i>
PKIURA3B-REV	GATCCAGCTCTTCGTAGTTTAATGGGGA GCGCTGATTCT	Amplificação de <i>KIURA3</i>
P2MICRAB-FOR	GACTTGGCTCTTCGCACAAACGAAGCA TCTGTGCTTCATTTTG	Amplificação de 2 <i>micra</i>
P2MICRAB-REV	GATCCAGCTCTTCCTTTGTATGATCCA ATATCAAAGGAAATGATAGCATTGAAGG	Amplificação de 2 <i>micra</i>