

**Proposta Projeto PIBIC:** Desenvolvimento de ferramentas de CRISPR-Cas9 para o estudo da estrutura mitocondrial por microscopia de expansão

**Pesquisador Responsável:** Douglas Adamoski Meira (LN Bio/CNPEM)

## 1 Introdução

Há mais de um bilhão de anos atrás, uma fagocitose falha de um procarioto primitivo derivou a organela que hoje chamamos de mitocôndria. Este evento, designado de endossimbiose, transformou-se na principal fonte energética e de blocos biossintéticos da agora chamada célula eucariótica, tornando-se parte imprescindível do metabolismo celular em processos de homeostase e de patologia, como no câncer.

Durante os milhares de anos do processo de domesticação mitocondrial, diversas de suas características foram moldadas de acordo com o ambiente celular para o melhor aproveitamento do potencial energético e biossintético, com uma especialização bioquímica e estrutural, em grande parte relacionada com a formação de uma complexa e dinâmica rede de mitocôndrias. Tal rede permanece em constante processo de fusão e fissão, o que modula a sua função e atividade dentro da célula.

Entretanto, modificar e modular a função desta organela com ferramentas moleculares é um trabalho desafiador. A utilização de estratégias de edição genômica, como CRISPR/Cas9 permite a modificação do gene endógeno, sem artefatos relacionados com a superexpressão do mesmo, e acompanhar os efeitos de modulações biológicas sobre o fenótipo da célula em condições mais próximas das reais.

Assim, este projeto tem por objetivo utilizar a glutaminase como gene nuclear com produto localizado na mitocôndria e criar ferramentas para a edição deste gene com o intuito de verificar a localização e morfologia do seu produto e as consequências da sua modificação para a função da organela, verificada através da sua morfologia, em um contexto de células de câncer de mama altamente dependentes do metabolismo mitocondrial.

## 2 Estado da arte e fundamentação teórica

### 2.1 Vetores lentivirais não-integrativos (NILVs, *Non-integrating lentiviral vectors*)

Sistemas de entrega de ácidos nucleicos utilizando lentivirus são baseados em versões modificadas do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), que permitem a substituição do material original da partícula infectiva por genes de interesse. Tais ferramentas são modificadas molecularmente para mitigar os riscos ao pesquisador que está manipulando os mesmos, com a remoção de elementos relacionados com a replicação e patogenicidade do genoma do HIV-1 e desenvolvimento de sistemas de empacotamento divididos em múltiplos plasmídeos, reduzindo o risco de recombinação e reconstituição de um vetor replicativo e com potencial patogênico<sup>1</sup>. Assim, mostram-se excelentes sistemas com baixo custo de implementação, alta eficiência de transdução e potencial de modificação de múltiplas linhagens celulares, mesmo as não replicativas, pela sua capacidade de transposição do poro nuclear<sup>1</sup>. Todavia, o processo de estabelecimento da expressão do transgene nas células infectadas se dá pela modificação do genoma com a inserção randômica do material genético carregado, modo de ação que implica em ao menos quatro mecanismos de modificação do fenótipo da célula em estudo que não são relacionados com o gene de interesse modificado: a interrupção de *enhancers* genômicos – reduzindo a expressão de genes –, desconfigurando promotores – abolindo a função de genes endógenos –, quebra de regiões exônicas – levando a produção de proteínas sem função – e ativação da estabilidade de mRNAs – com a inserção em regiões que darão origem a 3' UTR dos transcritos e modulando sua estabilidade<sup>2</sup>. Para mitigar estes riscos, a produção de vetores de empacotamento com mutações na integrase do HIV-1 combina a alta eficiência de transdução viral entregue por esta plataforma, com a transiência da expressão sem a modificação do genoma da célula hospedeira de maneira definitiva<sup>3</sup>. Isso se mostra como uma vantagem para estratégias de terapia gênica e de utilização de CRISPR/Cas9, com redução significativa da ocorrência de off-targets, justamente pela expressão transiente do sistema de modificação do genoma, tanto pela enzima quanto pelo RNA guia<sup>4</sup>.

## 2.2 Glutaminases

As glutaminases são enzimas que catalisam a conversão de glutamina em glutamato e participam de processos biossintéticos e energéticos dentro da célula<sup>5</sup>. Tais proteínas se mostraram capazes de organizarem-se em complexos maiores que tetrâmeros<sup>6</sup>, formando estruturas com aspecto de filamentos, que surgem no contexto celular quando da supressão de glutamina, criando superestruturas complexas no interior das células, visíveis por microscopia de fluorescência<sup>7</sup>. O genoma humano contém dois genes codificando as glutaminases, *GLS1*, com isoformas produzidas por *splicing alternativo* KGA e GAC, e *GLS2*, com isoformas produzidas por uso alternativo de início de transcrição GAB e LGA.

## 2.3 Morfologia mitocondrial e função

As mitocôndrias são conhecidas como a usina de energia da célula e desempenham um papel importante no tamponamento de cálcio, na liberação de espécies reativas de oxigênio e em metabólitos-chave para várias atividades em uma célula eucariótica. As mudanças na dinâmica e na morfologia mitocondrial regulam essas funções e sua regulação é, por sua vez, crucial para diversos processos morfogenéticos<sup>8</sup>. Diversos genes já são conhecidos como influenciando essa regulação como a dinamina (*DNML1*) e a mitofusina (*MFN1* e *MFN2*) estão envolvidos no balanço da fragmentação e fusão mitocondrial<sup>9</sup>, entretanto outros elementos do proteoma mitocondrial podem regular essa atividade celular.

## 2.4 Microscopia de expansão

Diversas técnicas de microscopia de fluorescência emergiram nos últimos anos para aumentar a resolução obtida, quebrando limites previamente estabelecidos para a ótica e recebendo particular atenção após os pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento da então chamada microscopia de superresolução serem laureados com o prêmio nobel<sup>10</sup>. Entretanto, estratégias similares a esta dependem de equipamentos complexos e estão limitadas a 10 nanômetros de resolução<sup>11</sup> e dependem de microscópios dedicados e de alta complexidade para sua utilização. Outra técnica emergente surgiu, explorando não capacidades distintas do microscópio realizando a captura, mas uma combinação de protocolos de manipulação da amostra que envolvem, de maneira simplificada, a fixação e o tratamento da amostra dentro de uma matriz polimérica que passa por um processo de expansão mecânica, distanciando os entes moleculares constituintes da amostra e aumentando a resolução obtida na mesma razão da expansão mecânica<sup>12</sup>. Tal estratégia permitiu que Shaib e colaboradores<sup>13</sup> extrapolassem a expansão mecânica para 10X as dimensões axiais da amostra, e permitindo atingir até 2 angstroms de resolução final com o uso de microscópio de super-resolução convencional. Com tal resolução, a compreensão da ultraestrutura celular pode ser realizada sem a necessidade de técnicas complexas de microscopia eletrônica ou utilizando tomografia de raio-X, e ainda assim retornando informação a nível molecular das mudanças conformacionais proteicas envolvidas no processo.

## 3 Objetivos

- 1) Estabelecer sistema lentiviral de empacotamento não integrativo, com a mutação D64V da Integrase do HIV utilizando ferramentas de biologia molecular.
- 2) Modificar de vetores de transferência lentiviral para a entrega de RNAs guia e braços de homologia com o objetivo de adicionar proteínas fluorescentes no C-terminal das isoformas de glutaminase humanas e introduzir mutações de ponto específicas utilizando ferramentas de biologia molecular.
- 3) Validar a funcionalidade do sistema de entrega não-integrativo e dos vetores de transferência com a utilização de cultivo de células de câncer de mama.
- 4) Avaliar a alteração da morfologia mitocondrial após as alterações genômicas utilizando microscopia de expansão

#### 4 Metodologia

Para o estabelecimento do sistema de empacotamento não integrativo, serão desenhados oligonucleotídeos para a introdução da mutação D64V na Integrase do HIV, que se mostrou a mais eficiente e mais capaz de manter a produção viral com títulos elevados<sup>3</sup>, com o auxílio do *QuikChange II Site-directed mutagenesis kit*. Utilizando ferramentas de biologia molecular básicas (PCR, enzimas de restrição, eletroforese, sequenciamento de DNA por Sanger) vetores de transferência serão modificados para compor:

- a) Vetor de expressão da enzimas Cas9 com tag fluorescente para transferência em sistema lentiviral
- b) Vetor de transferência com sítio para inserção sequência que expresse o RNA guia (gRNA), desenhado para a clivagem na região que codifica para o c-terminal das glutaminases humanas ou aminoácidos de relevância para o processo de filimentação, região de clonagem múltipla para inserção de braço de homologia (HDR) que funcione como região doadora para a inclusão de mutação ou de proteína fluorescente e, por fim, tag fluorescente para a identificação das células transduzidas com o vírus

Os sistemas modificados envolverão a inclusão de tag fluorescente em nas isoformas KGA e GAC do gene *GLS* e na isoforma GAB do gene *GLS2*, além de mutações de ponto no gene *GLS*. Após a produção dos sistemas de biologia molecular necessários para a modificação gênica, os vetores virais serão empacotados com sistema NILV para o vetor de transferência do gRNA-HDR-Tag e com sistema integrativo para o vetor que carrega a Cas9.

Posteriormente, os vetores lentivirais serão utilizados para a transdução de linhagens celulares de câncer de mama para a modificação do genoma das mesmas e o acompanhamento da morfologia mitocondrial e organização da glutaminase frente a desafios químicos e nutricionais. O produto deste cenário será avaliado por técnicas de microscopia convencionais e de super-resolução, utilizando a ferramenta de microscopia de expansão. Os dados obtidos serão quantificados utilizando algoritmos já desenvolvidos no grupo para a verificação dos impactos de mutações da glutaminase na morfologia mitocondrial.

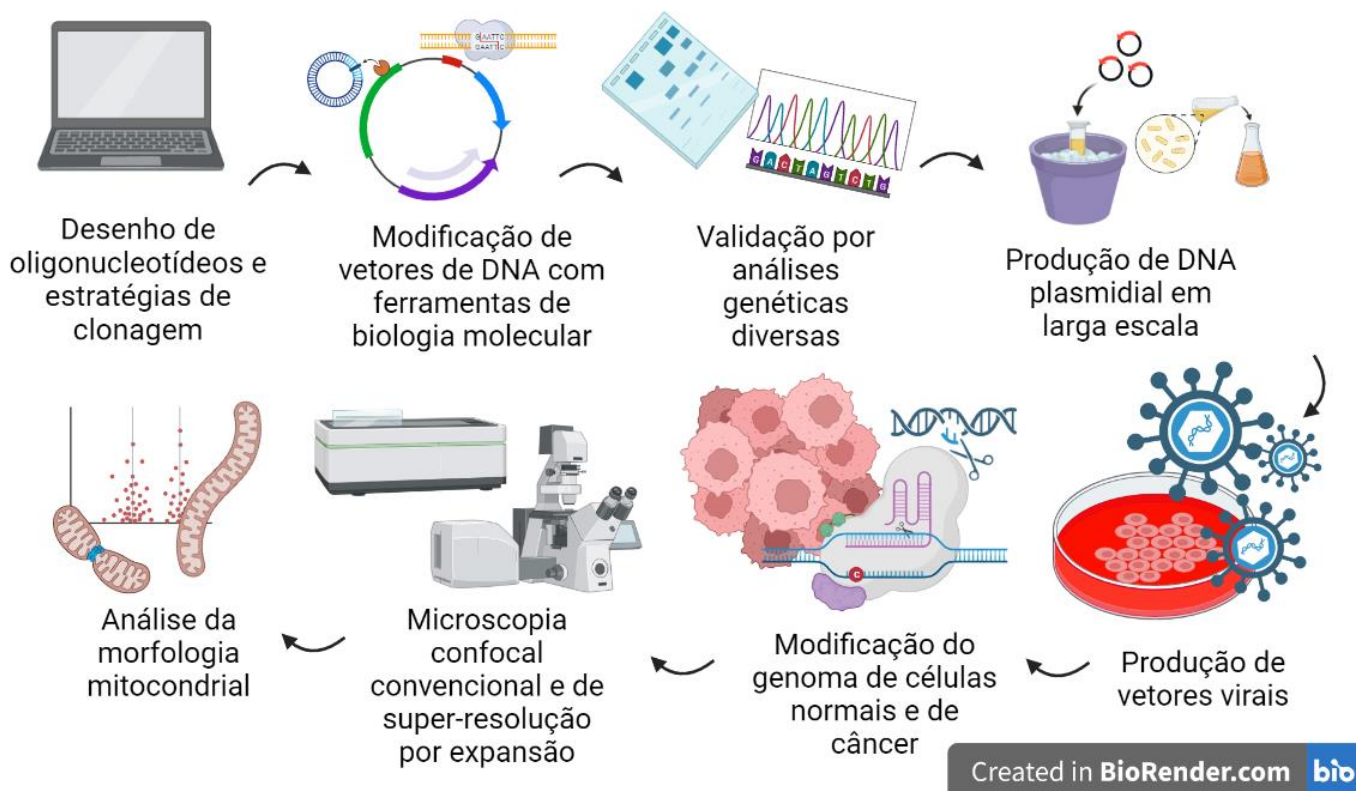


Figura: Representação geral da metodologia a ser utilizada no projeto.

## 5 Referências

1. Schlimgen, R. *et al.* Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. in *Journal of Occupational and Environmental Medicine* vol. 58 1159–1166 (Lippincott Williams and Wilkins, 2016).
2. Bushman, F. D. Retroviral Insertional Mutagenesis in Humans: Evidence for Four Genetic Mechanisms Promoting Expansion of Cell Clones. *Molecular Therapy* vol. 28 352–356 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2019.12.009> (2020).
3. Saeed, M. Q. *et al.* Comparison between several integrase-defective lentiviral vectors reveals increased integration of an HIV vector bearing a D167H mutant. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**, e213 (2014).
4. Apolonia, L. The Old and the New: Prospects for Non-Integrating Lentiviral Vector Technology. *Viruses* **12**, 1103 (2020).
5. Cassago, A. *et al.* Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. doi:10.1073/pnas.1112495109/-/DCSupplemental.
6. Ferreira, A. P. S. *et al.* Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 28009–28020 (2013).
7. Jiang, B. *et al.* Filamentous GLS1 promotes ROS-induced apoptosis upon glutamine deprivation via insufficient asparagine synthesis. *Mol Cell* **82**, 1821-1835.e6 (2022).
8. Madan, S., Uttakar, B., Chowdhary, S. & Rikhy, R. Mitochondria Lead the Way: Mitochondrial Dynamics and Function in Cellular Movements in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol* **9**, (2022).
9. Papanicolaou, K. N., Phillippo, M. M. & Walsh, K. Mitofusins and the mitochondrial permeability transition: the potential downside of mitochondrial fusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **303**, H243–H255 (2012).
10. Möckl, L., Lamb, D. C. & Bräuchle, C. Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 13972–13977 (2014).
11. Olivier, N., Keller, D., Gönczy, P. & Manley, S. Resolution Doubling in 3D-STORM Imaging through Improved Buffers. *PLoS One* **8**, e69004 (2013).
12. Chen, F., Tillberg, P. W. & Boyden, E. S. Expansion microscopy. *Science (1979)* **347**, 543–548 (2015).
13. Shaib, A. H. *et al.* Visualizing proteins by expansion microscopy. doi:10.1101/2022.08.03.502284.