

# Regulação fina de genes envolvidos em fenótipos importantes em *S. cerevisiae* para produção de etanol de segunda geração

Palavras-Chave: *Saccharomyces cerevisiae*, *XKS1*, *PKC1*

Autores/as:

Brenda Cristina de Souza - UNICAMP

Dr. Felipe da Silveira Bezerra de Mello (co-orientador) - UNICAMP

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador) - UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

A fim de diminuir a emissão de gases de efeito estufa na atmosfera, a produção de bioetanol a partir de resíduos agrícolas se demonstra como uma solução ambientalmente plausível, quando na constituição da indústria de segunda geração (2G). O material lignocelulósico é rico em xilose e glicose, necessitando da ação de microrganismos para fermentação de açúcares em seu processo.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui forte capacidade fermentativa em condições aeróbicas e anaeróbicas, e alta tolerância ao etanol [1]. Entretanto, não possui capacidade natural de metabolizar as pentoses – em abundância na constituição da biomassa vegetal –, mas conta com maquinaria endógena para metabolizar a xilulose (produto isomerizado da xilose) em etanol. Logo, a engenharia metabólica em *S. cerevisiae* que permita a conversão de xilose em xilulose são importantes para viabilizar a produção do álcool celulósico [1]. Para facilitar o fluxo de assimilação de xilose em *S. cerevisiae*, uma abordagem tradicional é a superexpressão de genes específicos, como a xiluloquinase (*XKS1*), que conecta a xilulose à via endógena da Pentose Fosfato (PPP) [1] [2] [3]. Ao mesmo tempo, é primordial que leveduras utilizadas em processos industriais sejam capazes de tolerar altas temperaturas - considerando que dornas de fermentação podem atuar acima de 40° [2] [3] - uma vez que essa afeta diretamente a viabilidade celular e cinética enzimática do organismo em questão.

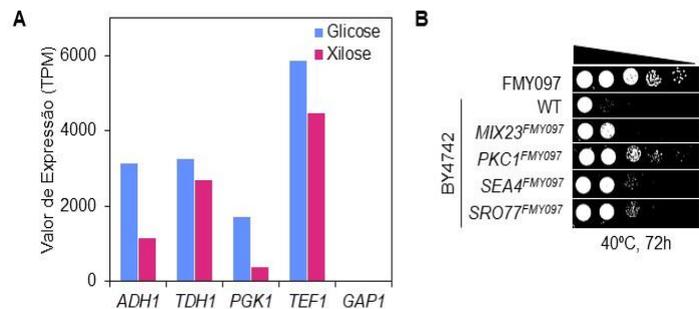
A partir de estudos realizados no Laboratório de Genômica e bioEnergia (LGE), que abordam a análise dos níveis de expressão dos transcritos de uma levedura em condições industriais de fermentação de xilose [6] e mutações pontuais interligadas à robustez térmica em *S. cerevisiae* [7], foram identificadas estruturas genéticas que permitem aumentar a eficiência fermentativa de xilose em condições industriais.

Para o primeiro estudo, a linhagem utilizada foi a Celere-2L, derivada da LUY34.4 - modificada e evoluída para consumo de xilose [3]. A cepa LUY34.4 apresenta como uma de suas modificações, a superexpressão de *XKS1* controlada pelo promotor *ADH1p*. A partir dos dados de expressão obtidos

pelo transcriptoma desta cepa obtidos em fermentação industrial 2G, pode-se observar que este promotor não é o mais expresso durante o consumo de xilose (**Figura 1a**). Para efeito de comparação, no mesmo gráfico, temos a expressão de *TDH1*, *PGK1* e *GAP1*, normalmente usados na literatura para construção de cassetes de expressão. Entretanto, é possível observar que *TEF1* apresenta uma expressão maior durante o consumo de xilose, indicando que seu promotor possa ser uma alternativa mais interessante para superexpressão da xiluloquinase.

No segundo estudo foi analisada a arquitetura genética do segregante FMY097 [8] da cepa industrial brasileira as-1 [9], descrita como tolerante a inibidores de fermentação encontrados no processo 2G. Neste trabalho, através do mapeamento de *quantitative trait loci* (QTL), foram encontradas mutações no gene essencial *PKC1* de FMY097 que permitem crescimento a 40°C em meio sólido (**Figura 1B**). Esse alelo possui mutações raras não sinônimas, que não estão presentes em outras linhagens. *PKC1*<sup>FMY097</sup> apresenta alterações nos aminoácidos K92R e S328T, localizadas nas regiões conectoras da proteína, as alças. Quando transferida para cepa suscetível BY4742, o alelo *PKC1*<sup>FMY097</sup> confere robustez térmica. *PKC1* é um gene participante da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), responsável por várias funções celulares importantes, inclusive resposta ao estresse térmico [10].

Nesse projeto, prevê-se estudar a influência de *TEF1p* na superexpressão de *XKS1*, a fim de gerar um aumento na produtividade de etanol celulósico. Por outro lado, pretende-se também avaliar a contribuição individual das mutações K92R e S328T em *PKC1* para a termotolerância em *S. cerevisiae* - um dos fenótipos mais importantes do ponto de vista biotecnológico.



**Figura 1:** Resultados de pesquisas anteriores no LGE que embasam a continuação de investigações sobre genótipos de interesse em cepas para E2G. **A:** gráfico de expressão de genes chave na via glicolítica ou PPP cujos promotores podem ser usados para superexpressão de *XKS1*. **B:** teste de *spot* a 40 °C de linhagens BY4742 contendo alelos de FMY097 identificados em estudo de QTL de uma linhagem industrial.

## METODOLOGIA:

- **Linhagens e meio de cultivo**

A linhagem de *S. cerevisiae* laboratorial BY4742 (*MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*) [4] será utilizada como background para teste da superexpressão de *XKS1* com diferentes promotores e mutações no gene *PKC1* que conferem termotolerância. A levedura será cultivada em YPD (10 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g.L<sup>-1</sup> peptona e 20 g.L<sup>-1</sup> glicose) para fins de inóculo e propagação. YNB (6.7 g.L<sup>-1</sup> base nitrogenada para levedura) suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> glicose, CSM-L (500 mg.L<sup>-1</sup> dropout de aminoácidos sem L-Leucina), ou YPD suplementado com 200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de geneticina G418 serão usados para seleção de células transformadas com marcador *LEU2* ou *KanMX*, respectivamente. YNB 0.5% glicose 2% xilose CSM-U (500 mg.L<sup>-1</sup> dropout de aminoácidos sem Uracila) será usada em teste de fermentação. Todos os cultivos serão realizados a 30 °C e 250 rpm, quando necessário agitação.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  será usada para propagação e manutenção de vetores de expressão em levedura. Células DH5 $\alpha$  serão cultivadas em meio Luria Bertani (10 g.L<sup>-1</sup> triptona, 5 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 5 g.L<sup>-1</sup> cloreto de sódio) adicionadas de 100 mg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina para amplificação de plasmídeos. O cultivo será feito a 37 °C e 250 rpm, quando necessário agitação. Em todos os casos, 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar será adicionado ao meio para cultivo em meio sólido e glicerol 50% será adicionado 1:1 para armazenamento estoque a -80 °C.

- **Biologia molecular geral**

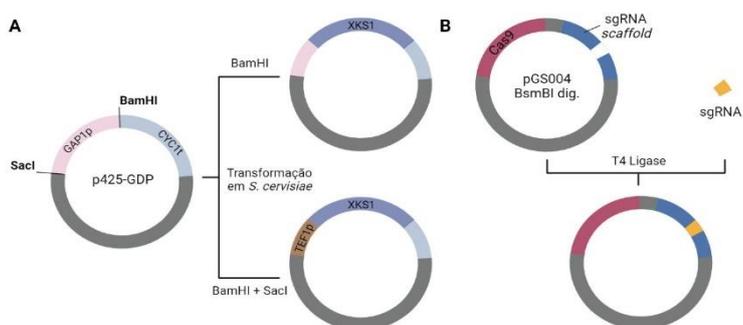
A transformação de levedura será realizada através do método PEG/LiAc, descrito por Gietz e cols. (2007) [5]. Transformação de células de *E. Coli* DH5 $\alpha$  será realizada pelo protocolo padrão de choque elétrico. Purificação de plasmídeos de bactéria será feito com um protocolo caseiro de miniprep. DNA genômico será extraído usando um protocolo rápido (LiOAc)-SDS/EtOH [8] para uso em reação em cadeia da polimerase (PCR), ou pelo método Fenol/Clorofórmio para ensaios de sequenciamento. Todas as reações de PCR serão realizadas usando a polimerase de alta fidelidade Phusion® de acordo com as instruções do fabricante (NEB).

- **Plasmídeos e clonagem**

Para montagem dos cassetes de expressão de *XKS1* será usado o vetor p425-GDP [6] como *backbone* da estrutura necessária para replicação e manutenção do material genético. O vetor consta com um promotor *GAP1p*, flanqueado por sítios de restrição *SacI* a 5' e *BamHI* a 3', e terminador *CYC1t*. Para construção do cassete controle para teste de superexpressão de *XKS1*, *GAP1p-XKS1-CYC1t*, o vetor p425-GPD será digerido com *BamHI* e a ORF - amplificada do genoma de BY4742 com homologias

externas ao sítio de digestão do *backbone* - será clonada a partir de transformação em *S. cerevisiae*. Para o cassete *TEF1p-XKS1-CYC1t*, p425-GDP será digerida com *SacI* e *BamHI* para remoção de *GAP1p*, e *TEF1p* e *XKS1* (também amplificadas a partir do genoma de BY4742) serão clonadas também via recombinação homóloga em levedura (**Figura 2A**). Uma xilose isomerase funcional de *Orpinomyces* será expressa em vetor (pXI) contendo o gene e marcador de seleção *URA3*.

O plasmídeo pGS004 [11] será usado como *backbone* para expressão de sgRNA específico para eventos de edição genômica usando a metodologia CRISPR-Cas9. Novos sgRNAs serão



**Figura 2:** Esquema das clonagens a serem realizadas na atual proposta. (A) Clonagem do gene *XKS1* no vetor p425-GDP a partir de duas estratégias: manutenção do promotor original do vetor (*GAP1p*) via linearização com enzima *BamHI* e posterior clonagem da ORF; remoção do promotor *GAP1* e substituição pelo *TEF1p*, via digestão com *BamHI* e *SacI*, simultaneamente. (B) Integração de oligo de dupla fita representando o sgRNA no vetor CRISPR-Cas9 pGS004 usando a enzima T4 ligase.

anelamento/extensão usando dois oligos de 24 bp, com 20 bp de sobreposição a 3'. A inserção de sgRNAs específicos neste vetor será feita via digestão do pGS004 por BsmBI, seguida de ligação via enzima T4 Ligase (**Figura 2B**).

- **Engenharia genética em *S. cerevisiae***

Para integração genômica de sequências de DNA, será utilizado o sistema CRISPR-Cas9. A integração de diferentes cassetes de expressão de *XKS1* será realizado no *locus HO*, usando o plasmídeo pGS004.30 (disponível no LGE) e a sequência a ser integrada amplificada por PCR. Para edição dos aminoácidos K92 e S328 em *PKC1*, serão utilizados vetores pGS004 contendo sgRNA diferentes próximos a cada posição a ser alterada, e uma sequência de dupla fita sintetizada de 90 bp contendo a mutação de interesse e alteração na sequência PAM para desativar edições subsequentes. Para cada transformação será usada 1 µg do vetor e do DNA doador.

- **Validação dos fenótipos**

Cepas com superexpressão de *XKS1* e expressando pXI serão avaliadas de acordo com sua produtividade e rendimento de etanol em fermentação semi-anaeróbica. Cultivos serão realizados em garrafas do tipo Shott de 100 mL contendo 80 mL de meio YNB 0.5% glicose 2% xilose CSM-U, com uma densidade ótica inicial (DO<sub>600</sub>) de 1.0, 30 °C e 100 rpm. A quantificação dos açúcares consumidos e metabólitos produzidos será feita em análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para validação das mutações em *PKC1* que possam conferir termotolerância, as cepas editadas serão fenotipadas em teste do tipo *spot*. 5µL de diluições subsequentes de uma cultura com DO<sub>600</sub> de 1.0 serão plaqueadas em YNB 2% glicose. As placas serão mantidas a 40 °C por até 96h, quando serão fotodocumentadas para análise.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Os resultados obtidos nesta proposta serão avaliados em duas frentes: i) o efeito de um promotor forte na expressão de *XKS1* - um gene chave para a via PPP - e consequente produção de etanol a partir de xilose; e ii) o efeito de duas mutações não sinônimas em *PKC1* - gene essencial participante da via da integridade da parede celular - para o aumento da tolerância a altas temperaturas em *S. cerevisiae*. Para o primeiro ponto, será avaliada a produtividade e rendimento de etanol em cepas com o mesmo *background* expressando uma xilose isomerase, diferenciando apenas no promotor usado para superexpressão de *XKS1*. Os resultados obtidos em fermentação poderão responder se a escolha de promotor para superexpressão deste gene é relevante para o consumo de pentose e rendimento final de bioetanol em cepas industriais. Já para o segundo ponto, será avaliado se uma das mutações encontradas em um alelo de *PKC1* (K92R e S328T) confere, isoladamente, capacidade de crescimento a 40 °C. As cepas mutadas serão avaliadas de acordo com sua resposta ao estresse de temperatura em meio sólido, a priori. O resultado deste ensaio permitirá analisar a contribuição de mutações não sinônimas em *PKC1* para termotolerância.

Até o presente momento, foram realizadas digestões no plasmídeo P425 com as enzimas de restrição SacI e BamHI, resultando, portanto, no plasmídeo linearizado e no promotor isolado. Também, foi amplificado o promotor *TEF1p* a partir do genoma da linhagem BY4742. Este material será usado para montagem de um vetor modular para construção de cassetes usando *TEF1p* como promotor. Demais atividades estão em andamento, e os resultados obtidos até o momento representam os 2 meses iniciais de atividade do projeto.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Wahlbom, A. Eliasson, and B. Hahn-Hägerdal, "Intracellular fluxes in a recombinant xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 72, pp. 289–296, Mar. 2001, doi: 10.1002/10970290(20010205)72:33.0.CO;2-9.
- [2] Y. Jin, H. Alper, Y. Yang, and G. Stephanopoulos, "Improvement of Xylose Uptake and Ethanol Production in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an Inverse Metabolic Engineering Approach," vol. 71, no. 12, pp. 8249–8256, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.12.8249.
- [3] L. Vieira et al., "Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains," *Nat. Publ. Gr.*, no. November, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1038/srep38676.
- [4] F. B. Pereira, D. G. Gomes, and A. Teixeira, "Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae*," pp. 45–53, 2012, doi: 10.1007/s10529-0110735-0.
- [5] M. R. J. Bothast, "Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol," pp. 19–25, 2005, doi: 10.1007/s00253-004-1819-8.
- [6] L. M. Carvalho et al., "Understanding the differences in 2G ethanol fermentative scales through omics data integration," *FEMS Yeast Res.*, vol. 21, no. 4, May 2021, doi: 10.1093/femsyr/foab030.
- [7] S. Bezerra, D. Mello, A. Luis, and V. Coradini, "GENETIC MAPPING OF A BIOETHANOL YEAST STRAIN REVEALS NEW TARGETS FOR ALDEHYDE- AND THERMOTOLERANCE," 2021.
- [8] F. Mello, A. Coradini, P. Tizei, M. Carazzolle, G. Pereira, and G. Teixeira, "Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain," *Biomass and Bioenergy*, vol. 120, pp. 49–58, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.biombioe.2018.10.019.
- [9] L. C. Basso, H. V de Amorim, A. J. de Oliveira, and M. L. Lopes, "Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.," *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 1155–63, Nov. 2008, doi: 10.1111/j.15671364.2008.00428.x.
- [10] C. Auesukaree et al., "Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Appl. Genet.*, vol. 50, no. 3, pp. 301–310, Sep. 2009, doi: 10.1007/BF03195688.
- [11] de Mello FDSB, Maneira C, Suarez FUL, Nagamatsu S, Vargas B, Vieira C, Secches T, Coradini ALV, Silvello MAC, Goldbeck R, Pereira GAG, Teixeira GS. Rational engineering of industrial *S. cerevisiae*: towards xylitol production from sugarcane straw. *J Genet Eng Biotechnol.* 2022 May 25;20(1):80. doi: 10.1186/s43141-022-00359-8. PMID: 35612634; PMCID: PMC9133290.