



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fernanda Gelsleichter

**O papel da α -arrestina Art7 na expressão de transportadores de açúcares na
levedura *Saccharomyces cerevisiae***

Florianópolis
2022

Fernanda Gelsleichter

O papel da α -arrestina Art7 na expressão de transportadores de açúcares na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.
Coorientador: Angela Alves dos Santos, Dra.

Florianópolis
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gelsleichter, Fernanda

O papel da alfa-arrestina Art7 na expressão de transportadores de açúcares na levedura *Saccharomyces cerevisiae* / Fernanda Gelsleichter ; orientador, Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, coorientadora, Angela Alves dos Santos, 2022.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Ubiquitinação. 3. Glicose. 4. Xilose. 5. Etanol. I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte. II. dos Santos, Angela Alves. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Fernanda Gelsleichter

O PAPEL DA α -ARRESTINA Art7 NA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE AÇÚCARES NA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado, em sua forma final, pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 11 de março de 2022



Documento assinado digitalmente
Daniela Cristina de Toni
Data: 14/03/2022 08:49:29-0300
CPF: 774.080.129-15
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Daniela Cristina de Toni, Dra.
Coordenadora do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Data: 11/03/2022 18:22:33-0300
CPF: 057.643.048-06
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Carlos Peres Silva
Data: 12/03/2022 11:59:21-0300
CPF: 232.039.193-20
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Carlos Peres Silva, Dr.

Avaliador

Universidade Federal de Santa Catarina

Sérgio
Luiz Alves
Júnior

Assinado de forma
digital por Sérgio
Luiz Alves Júnior
Dados: 2022.03.14
15:48:05 -03'00'

Prof. Sérgio Luiz Alves Júnior, Dr.

Avaliador

Universidade Federal da Fronteira Sul

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Boris Stambuk, por aceitar me orientar e pela paciência durante esses anos de Iniciação Científica.

A minha colega de laboratório e co-orientadora, Angela Alves dos Santos. Sei que não foi fácil me ajudar e me direcionar, sempre te pedindo conselhos e ficando perdida nas inúmeras tarefas no laboratório. Tenho muito a te agradecer por todos os ensinamentos, paciência e dedicação com que você lida com as demandas do laboratório. Desde a minha entrada no laboratório, em todo meu percurso na Iniciação Científica e durante a escrita deste trabalho, você me ajudou e continua me ajudando bastante. Muito obrigada. Agradeço também aos demais colegas de laboratório, Eduardo, Leonardo e Cristina (ainda que de outro laboratório) pelas risadas, pelo aprendizado e pela convivência.

À minha família, Rosemere, José, Sara e principalmente Vitor, por sempre me apoiarem e me ajudarem a correr atrás dos meus sonhos. Este trabalho não existiria sem o apoio de vocês.

A todos os outros colegas, professores e amigos que, de alguma forma, tenham influenciado na minha caminhada até aqui, muito obrigada.

Ao Programa PIBIC/CNPq/UFSC pela Bolsa de Iniciação Científica durante vários anos, e ao CNPq e FINEP pelo apoio financeiro ao laboratório.

*Your dream is over, or has it just begun?
(Silent Lucidity - Queensrÿche)*

RESUMO

Quando se trata da produção eficiente de etanol, e principalmente do Etanol de Segunda Geração (etanol 2G), sabe-se que existem fatores que geram limitações significativas na produção deste pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por exemplo, a ineficiência deste microrganismo na internalização e fermentação da xilose, uma pentose de abundante presença na biomassa da cana-de-açúcar, que é a matéria-prima utilizada na produção do etanol 2G brasileiro. Sabendo-se desta limitação, vê-se necessária a construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* (através do uso de ferramentas de Engenharia Genômica, Biologia Molecular e demais áreas biotecnológicas relacionadas ao estudo de leveduras) que sejam, de fato, capazes de realizar a internalização e a fermentação eficiente desta pentose, com ênfase no sucesso desta fermentação em escala industrial. A captação da xilose pela levedura *S. cerevisiae* ocorre através da atividade de transportadores de hexose (como a glicose) conhecidos como Hxt, cuja função é realizar o transporte deste açúcar através da membrana celular, em direção ao interior da célula. Porém, estes transportadores possuem uma afinidade maior pela glicose, dificultando a internalização de xilose por meio destes transportadores. Além disso, estudos recentes tem demonstrado processos de internalização e posterior degradação de transportadores de açúcar, cuja regulação ocorre em resposta a diferentes concentrações de glicose, através da ubiquitinação dos transportadores. Entretanto, pesquisadores vêm demonstrado que a deleção de alguns genes específicos, como o *ROD1* e *ROG3* (genes que codificam α -arrestinas que participam do processo de ubiquitinação destes transportadores de membrana) podem ser capazes de evitar a endocitose dos transportadores de açúcar. Sabendo-se disso, neste trabalho, a linhagem *hxt-null* DLG-K1 (sem os principais transportadores Hxt1-Hxt7 e Gal2) foi modificada com a deleção dos genes *ROD1* e/ou *ROG3*, e a sobre-expressão do transportador Hxt7. A seguir, foi realizada a avaliação das performances de fermentação desta linhagem recombinante (DLGK1T7 Δ rog3) transformada com um plasmídeo multicópia contendo o transportador Hxt7. Os resultados obtidos indicam que a deleção das duas arrestinas prejudicou a performance da levedura. Com a deleção do gene *ROG3*, as leveduras DLGK1T7 Δ rog3 demonstram uma melhor fermentação das células em glicose, e também um melhor consumo desta fonte de carbono pela levedura. O que sugere que o gene *ROG3* (*Art7*) estaria envolvido na endocitose e remoção do transportador Hxt7 em altas concentrações de glicose, e também durante a cofermentação, porém nenhum efeito positivo pode ser observado no consumo de xilose (em meios contendo somente xilose) e fermentação desta pela ausência da arrestina *Art7* nas cepas com expressão dos transportadores Hxt7. Este resultado sugere que as arrestinas envolvidas na endocitose do transportador Hxt7 na presença de altas concentrações de glicose podem ser diferentes quando a fonte de carbono é a xilose.

Palavras-chave: Ubiquitinação. Glicose. Etanol 2G. Xilose. Levedura.

ABSTRACT

When it comes to the efficient production of ethanol, and especially of Second Generation Ethanol (2G ethanol), it is known that there are factors that generate significant limitations in its production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. For example, the inefficiency of this microorganism in the internalization and fermentation of xylose, a pentose that is abundantly present in sugarcane biomass, which is the raw material used in the production of Brazilian 2G ethanol. Knowing this limitation, it is necessary to build recombinant strains of *S. cerevisiae* (through the use of tools from Genomic Engineering, Molecular Biology and other biotechnological areas related to the study of yeasts) that are, in fact, capable of performing the internalization and efficient fermentation of this pentose, with emphasis on the success of this fermentation on an industrial scale. The uptake of xylose by the yeast *S. cerevisiae* occurs through the activity of hexose transporters (such as glucose) known as Hxt, whose function is to carry out the transport of this sugar through the cell membrane, towards the interior of the cell. However, these transporters have a greater affinity for glucose, making it difficult to internalize xylose through these transporters, in addition to recent studies have shown that processes of internalization and subsequent degradation of sugar transporters occur, whose regulation occurs in response to different concentrations of glucose, occurring through the ubiquitination of transporters. However, researchers have demonstrated that the deletion of some specific genes, such as *ROD1* and/or *ROG3* (genes that encode α -arrestins that participate in the ubiquitination process of these membrane transporters) may be able to prevent endocytosis of sugar transporters. Knowing this, in the present work, the *hxt-null* DLG-K1 strain (without the main transporters Hxt1-Hxt7 and Gal2) was modified with the deletion of the *ROD1* and *ROG3* genes, and the overexpression of the Hxt7 transporter. Then, the fermentation performances of these recombinant strains (DLGK1 Δ rog3) transformed with a multicopy plasmid containing the Hxt7 transporter were evaluated. The results obtained indicate that the deletion of the two arrestins impaired the performance of the yeast. With the deletion of the *ROG3* gene, DLGK1T7 Δ rog3 yeasts demonstrate a better fermentation of the cells in glucose, and also a better consumption of this source of carbon by the yeast. This suggests that the *ROG3* gene (Art7) would be involved in endocytosis, and removal of the Hxt7 transporter at high glucose concentrations, and also during co-fermentation, but no positive effect could be observed on xylose consumption (in media containing only xylose) and fermentation of this by the absence of Art7 arrestin in the strains with expression of Hxt7 transporters. This result suggests that the arrestins involved in endocytosis of the Hxt7 transporter in the presence of high glucose concentrations can be different when the carbon source is xylose.

Keywords: Ubiquitination. Glucose. Ethanol 2G. Xylose. Yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Produção de etanol a partir do uso de cana-de-açúcar.	24
Figura 2.2 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.	24
Figura 2.3 – Esquematização da estrutura dos transportadores da família MSF, com 12 segmentos transmembrana.	27
Figura 2.4 – Esquematização do papel das arrestinas como reguladores endocitose de transportadores.	31
Figura 3.1 – Construção dos módulos de deleção Ble^R e Kan^R	38
Figura 3.2 – Deleção dos genes <i>ROG3</i> e <i>ROD1</i>	40
Figura 4.1 – Confirmação da deleção do gene <i>ROG3</i> com Ble^R	44
Figura 4.2 – Confirmação da deleção do gene <i>ROD1</i> com Kan^R	45
Figura 4.3 – Digestão com enzimas de restrição, realizadas a partir do mini-prep, para verificação e confirmação do plasmídeo.	46
Figura 4.4 – Confirmação da inserção do plasmídeo pGK na linhagem DLGK1T7.	47
Figura 4.5 – Fermentação aeróbia em meios contendo 4% de glicose	49
Figura 4.6 – Fermentação aeróbia em meios contendo 4% de glicose e 4% xilose	49
Figura 4.7 – Fermentação aeróbia em meios contendo 4% xilose	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Afinidade dos transportadores Hxt pela glicose	29
Tabela 2 – Linhagens de Leveduras utilizadas.	33
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores e plasmídeo utilizado.	37
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos da fermentação.	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	ETANOL DE 1ª E 2ª GERAÇÃO	23
2.2	<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	25
2.3	TRANSPORTE DE AÇÚCAR EM <i>S. CEREVISIAE</i>	25
2.4	METABOLIZAÇÃO DA XILOSE	27
2.5	TRANSPORTADORES HXT	28
2.6	ENDOCITOSE DE TRANSPORTADORES	30
3	MATERIAIS E METÓDOS	33
3.1	LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS	33
3.2	MEIOS DE CULTURA	33
3.3	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	34
3.3.1	Extração de DNA genômico	34
3.3.2	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	34
3.3.3	Eletroforese em Gel de Agarose	35
3.3.4	Obtenção do Módulo de Deleção	35
3.3.5	Concentração dos fragmentos de DNA amplificados	36
3.3.6	Transformação de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.3.7	Deleção dos genes <i>ROD1</i> e <i>ROG3</i>	39
3.3.8	Extração de DNA plasmidial (Mini-Prep)	41
3.3.9	Ensaio fermentativos com as linhagens de levedura	41
3.3.10	Determinação dos substratos e produtos das fermentações	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Quando se trata do uso de combustíveis fósseis para produção de energia, como carvão e petróleo, pode-se enumerar diversos problemas, como poluição, agravamento e aceleração do efeito estufa, esgotamento de fontes de energia (energia não-renovável), entre outras. Frente a isso, cada vez mais tem-se buscado fontes alternativas para produção de combustíveis renováveis e ecológicos, com isso, a produção de etanol teve um grande destaque.

A partir do uso de matérias-primas renováveis, a fabricação de biocombustíveis tem atraído inúmeros estudos nas mais diversas áreas, uma vez que seu uso não gera grandes impactos negativos ao meio ambiente. Dentre os combustíveis renováveis, o etanol e o biodiesel têm sido os que mais recebem destaque, sendo o etanol produzido principalmente a partir de produtos vegetais ricos em açúcares e amido (BUŠIĆ *et al.*, 2018).

No Brasil, a demanda por fontes alternativas de produção de combustíveis surgiu na década de 1970, devido à crise mundial do petróleo. Em alternativa à crise, foi desenvolvido no Brasil o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que visava financiar a criação de usinas de produção de etanol, o aumento do plantio de cana-de-açúcar, que é a matéria-prima utilizada na produção do etanol brasileiro, e estimular a utilização do etanol como combustível veicular (AMORIM *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2016). A partir destas políticas nacionais e do desenvolvimento de tecnologias ligadas a esse setor, como o desenvolvimento da tecnologia dos carros Flex em meados de 2003, o Brasil se tornou um dos maiores produtores de etanol do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (GOLDEMBERG, 2008).

O etanol brasileiro é produzido através da fermentação dos açúcares presentes no caldo da cana-de-açúcar, realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo unicelular e robusto, que possui diversas qualidades que tornam-no um padrão mundial para produção de etanol em escala industrial (STAMBUK, 2019). Este processo fermentativo dá origem ao chamado etanol de primeira geração (Etanol 1G).

A cana-de-açúcar também é amplamente utilizada na produção de alimentos, como o açúcar, e esses processos geram uma grande quantidade de resíduos, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. Esses resíduos são comumente utilizados para produção de energia na própria indústria, como fonte de calor para queima em caldeiras de usina à combustão (MAGA *et al.*, 2019). Entretanto, cada vez mais se tem pensado no uso desta biomassa para incrementar a produção de etanol, visto que ela é rica em açúcares fermentáveis. Neste caso, o etanol produzido é chamado de etanol de segunda geração, ou Etanol 2G (ROBAK; BALCEREK, 2018).

As vantagens do uso da biomassa vão além do aumento da produção final do etanol, pois também englobam questões ambientais como o uso de área agrícola e diminuição dos resíduos não-aproveitados, visto que a reutilização dessa biomassa não implica no uso de novas áreas de terra agricultáveis. Isso faz com que os impactos agrícolas sejam mínimos, favorecendo econômica e ambientalmente essa utilização (MAGA *et al.*, 2019).

Para a produção do Etanol 2G, é necessário realizar a fermentação dos açúcares presentes na biomassa. Devido à sua origem, esse produto é composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo a hemicelulose rica em xilose, a pentose mais abundante desta biomassa e o segundo açúcar mais abundante na natureza. Em função disso, esses compostos químicos demandam processos de pré-tratamento, podendo ser usados agentes físicos ou químicos, de forma a quebrar e liberar os açúcares para que possam ser posteriormente fermentados e transformados em etanol pela levedura (ROBAK; BALCEREK, 2018).

Infelizmente, a *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar naturalmente a xilose (PATIÑO *et al.*, 2019). Contudo, como já dito, essa levedura possui diversas outras características que a tornam valiosa, como robustez e sequenciamento genômico conhecido, o que faz com que seja o principal organismo utilizado em estudos de engenharia genética, a fim de realizar modificações sobre ele e torná-lo capaz de metabolizar a xilose e, com isso, produzir Etanol 2G de forma eficiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Utilizar a engenharia genômica, através da deleção do gene *ROG3* e/ou *ROD1* e sobre-expressão do transportador HXT7, para promover a melhor fermentação de açúcares por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Deletar o gene *ROG3* e/ou *ROD1* da linhagem de *S. cerevisiae* recombinante DLG-K1 (linhagem *hxt-null* com os principais genes que codificam para os transportadores de hexoses deletados, e com sobre-expressão dos genes responsáveis pela metabolização de xilose).
- Transformar a linhagem recombinante contruída ($\Delta rog3$ e/ou $\Delta rog3rod1$) com plasmídeo multicópia contendo o gene *HXT7*.
- Analisar as performances fermentativas da linhagem recombinante e de sua parental em meios contendo glicose e/ou xilose como fonte de carbono.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETANOL DE 1ª E 2ª GERAÇÃO

Apesar dos problemas apresentados pelo uso de energias não-renováveis como petróleo e carvão vegetal, estas ainda são responsáveis pela demanda energética mundial atual. Entretanto, preocupações em relação às reais reservas mundiais, aliadas aos impactos ambientais gerados pelo uso destas fontes de energia, tem feito com que se pense cada vez mais em fontes alternativas de produção de combustíveis renováveis e menos poluentes, além da diminuição da dependência no petróleo. Dos biocombustíveis conhecidos, os mais utilizados são o etanol e o biodiesel, com o etanol representando mais de 70% da produção mundial de biocombustíveis renováveis, sendo os Estados Unidos e o Brasil os maiores produtores de etanol, responsáveis por 80% da produção mundial (BENTIVOGLIO; FINCO; BACCHI, 2016; JACOBUS *et al.*, 2021).

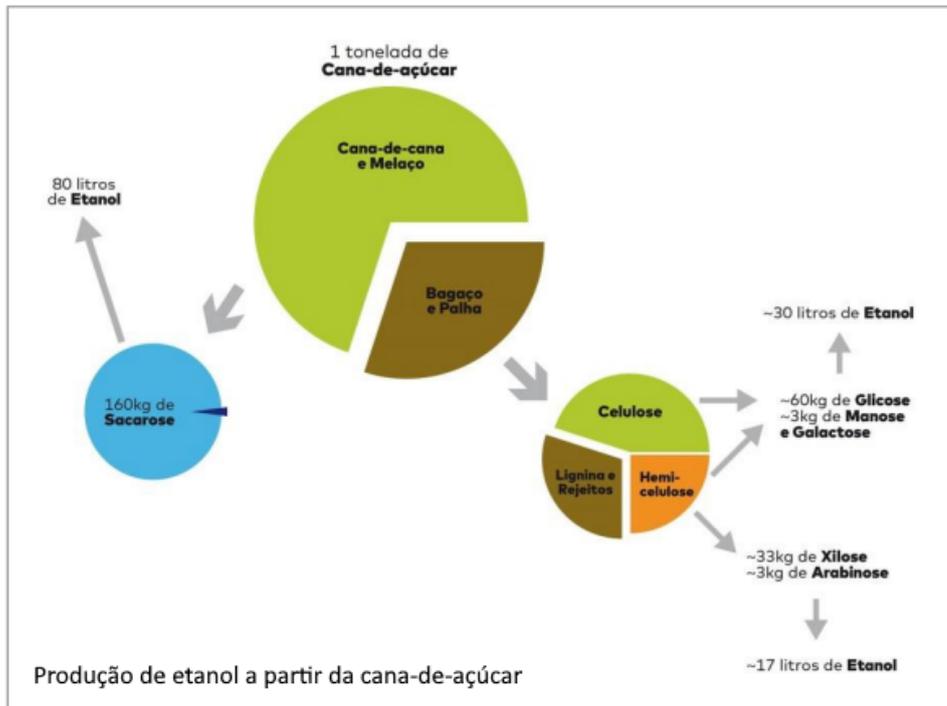
O etanol brasileiro é feito através da fermentação dos açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar, processo realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que utiliza a sacarose presente no caldo da cana no processo fermentativo, produzindo o Etanol 1G. A estrutura da sacarose permite o uso imediato como fonte de carbono pela levedura *S. cerevisiae*, dispensando tratamentos prévios de quebra do material a ser utilizado pela levedura no processo de produção de etanol (MARQUES *et al.*, 2015).

Além do plantio de cana-de-açúcar para produção de biocombustíveis, o Brasil também é um grande produtor mundial de açúcar como alimento e, aliando essas duas produções em larga escala, os resíduos gerados durante o processo são grandes, principalmente na forma de palha e bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço gerado nessa produção geralmente é usado como fonte de energia na própria usina, sendo queimado para geração de calor e eletricidade (MAGA *et al.*, 2019).

Entretanto, estudos têm demonstrado que esses resíduos (biomassa lignocelulósica) são ricos em açúcares fermentáveis como glicose e xilose que podem, então, ser utilizados como fonte de produção de etanol, aproveitando não somente o caldo da cana-de-açúcar, mas sim a planta como um todo e, neste caso, o etanol produzido através do uso da biomassa lignocelulósica passa a se chamar Etanol 2G, aumentando a produção final de etanol em cerca de 50% sem comprometer o uso de áreas agrícolas para a plantação de cana-de-açúcar, como pode ser observado na Figura (2.1) (ROBAK; BALCEREK, 2018; STAMBUK *et al.*, 2008).

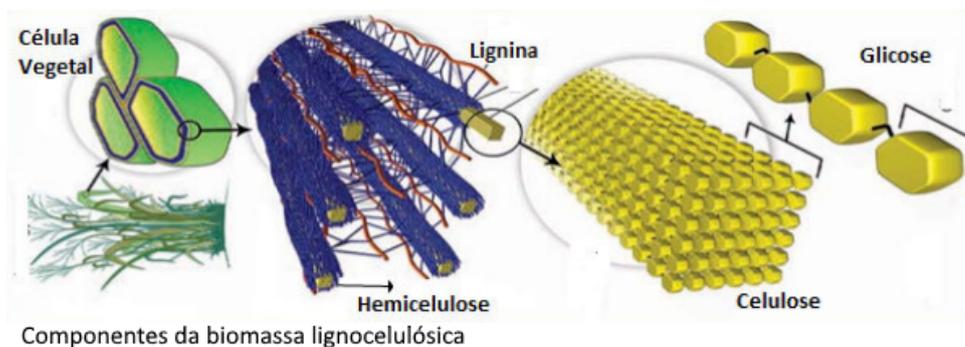
Essa biomassa faz parte da parede celular da planta, e sua composição é feita de polissacarídeos de celulose (em torno de 40% a 60%) e de hemicelulose (entre 20% e 40%), que se encontram cercados por um emaranhado de lignina, como mostrado na Figura (2.2) (ZHANG; DONALDSON; MA, 2012).

Figura 2.1 – Produção de etanol a partir do uso de cana-de-açúcar. Em azul, do lado inferior esquerdo, observa-se o processamento atual no uso de cana de açúcar (Etanol 1G), e do lado inferior direito, temos uma visão de como seria a produção de etanol a partir de bagaço e palha de cana-de-açúcar (Etanol 2G).



Fonte: Adaptado de Stambuk *et al.* (2008).

Figura 2.2 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Yarris (2010).

Porém, quando utilizada essa biomassa (bagaço e palha) na produção de etanol 2G, vê-se necessário um pré-tratamento e posterior hidrólise da estrutura lignocelulósica que compõe a parede celular das plantas, visto que estes compostos estão fortemente estruturados nesta estrutura vegetal, tratamento esse que pode depender de agentes químicos e/ou físicos que visam a quebra e disponibilização destes componentes que se encontram fortemente ligados, sendo quebrados em moléculas menores que podem, portanto, facilitar a metabolização dos açúcares que serão utilizados pela levedura na produção de etanol 2G (SARITHA; ARORA; NAIN, 2012).

Apesar dos benefícios gerados pelo uso da biomassa lignocelulósica na produção final de etanol, fatores como custos com pré-tratamentos e condições de processamento acabam dificultando a viabilidade da produção de etanol 2G em larga escala industrial, além do fato de ser necessário o uso de um microrganismo capaz de fermentar eficientemente tanto a glicose quanto a xilose, visto que a levedura *S. cerevisiae*, usada na produção de etanol 1G, não é capaz de fermentar naturalmente a xilose, já que esta levedura não expressa as enzimas necessárias à metabolização da xilose e de outras pentoses, dificultando o processo de produção de etanol 2G (PITKANEN *et al.*, 2003; PATIÑO *et al.*, 2019). Mesmo frente a essas limitações, a *S. cerevisiae* continua sendo o organismo escolhido para a produção de etanol 2G, devido a inúmeras qualidades que tornam esse microrganismo o principal a ser usado em processos fermentativos (STAMBUK, 2019).

2.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo unicelular conhecido há milênios pela humanidade, sendo utilizada ao longo da história, e até hoje, na produção de pães e bebidas fermentadas, como a cerveja e o vinho. Atualmente, este organismo é utilizado também para fins biotecnológicos como a produção industrial de etanol combustível. Pelo fato de possuir o seu genoma completamente sequenciado, este microrganismo continua sendo amplamente estudado, a fim de entender o funcionamento e possíveis formas de modificar geneticamente seu metabolismo e, por causa disso, é um dos principais organismos utilizados para estudos envolvendo fermentação e produção de etanol. Dentre as inúmeras características apresentadas por esta levedura, estão:

- Sequenciamento genômico completo;
- Fácil manuseio e cultivo em laboratório;
- Robustez industrial;
- Alta tolerância a estresses de pH;
- Alta tolerância a variações de temperatura.

Essas vantagens são de grande importância, principalmente em se tratando da produção de etanol em escala industrial, visto que a possibilidade de ocorrer estresses oxidativos como tolerância ao etanol, além de contaminação por outros microrganismos é alta, e é preferível que a levedura utilizada consiga suportar tais condições adversas (MATSUSHIKA *et al.*, 2009).

2.3 TRANSPORTE DE AÇÚCAR EM *S. CEREVISIAE*

Apesar de ser uma excelente fermentadora de glicose (uma hexose), essa levedura não é capaz de metabolizar naturalmente a pentose xilose, o segundo carboidrato mais abundantemente encontrado na biomassa lignocelulósica utilizada para produção de etanol de segunda geração, como será discutido a seguir. Entretanto, a *S. cerevisiae* possui os genes que expressam

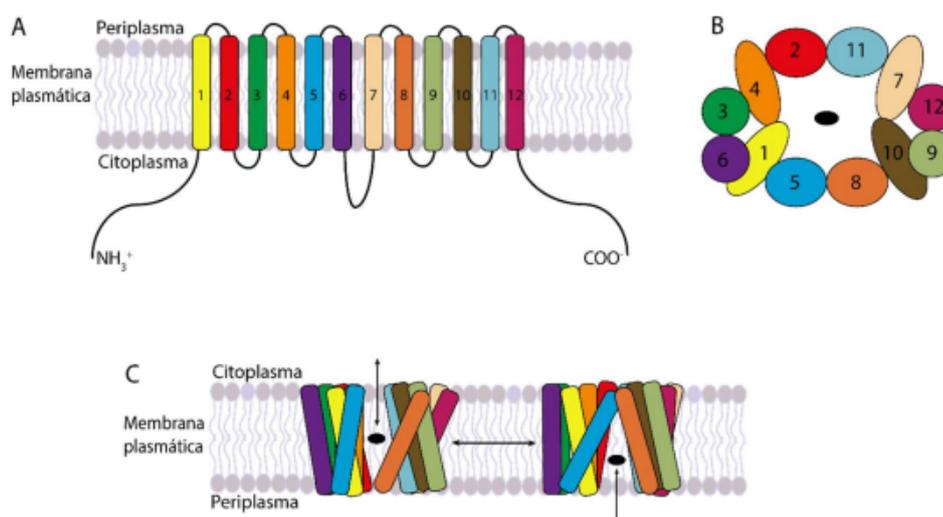
as enzimas iniciais para metabolização da xilose, como a xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulose cinase, porém suas atividades são baixas, demandando o uso de ferramentas de engenharia genética a fim de otimizar essa atividade metabólica. Apesar dos incontáveis avanços no desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de fermentar de maneira competente a xilose em escalas industriais, dificuldades como problemas na captação desta pentose, além da constante busca por métodos que melhorem o desempenho nesta rota metabólica intracelular, estão em constante desenvolvimento.

A internalização da xilose pela levedura é um passo limitante na metabolização da mesma. Açúcares como a glicose e a xilose precisam adentrar na célula da levedura para poder, então, seguir em direção à via metabólica. A entrada destes açúcares ocorre através da membrana plasmática, por meio de proteínas transportadoras, podendo ocorrer por meio de difusão facilitada ou por transporte ativo (HORÁK, 1997; STAMBUK *et al.*, 2008). Ainda que a *S. cerevisiae* não possua os genes que expressam transportadores xilose-específicos, a assimilação da pentose xilose é feita através de transportadores de hexoses (como a glicose), conhecidos como Hxt, porém essa assimilação de pentoses ocorre com uma menor eficiência quando comparada às hexoses (MATSUSHIKA *et al.*, 2009). Além disso, esses transportadores de hexose são frequentemente alvos de endocitose, processo que depende de ubiquitinação de resíduos de lisina na porção citoplasmática do transportador, e que serão, então, degradados no vacúolo celular (HICKE, 1997).

Os transportadores de açúcares encontrados na levedura *S. cerevisiae* fazem parte de uma vasta família de proteínas transmembrana, que se encontram ancoradas na membrana da célula e são chamadas de Superfamília dos Facilitadores Maioritários (MFS)¹ (HENDERSON, 1993; SAIER, 2000). A estrutura desta família de transportadores é caracterizada pela presença de 12 segmentos transmembranares (de TM1 a TM12), com presença abundante de aminoácidos com características hidrofóbicas, que formam estruturas em α -hélices, que atravessam a membrana e se conectam entre si por porções hidrofílicas, em ziguezague, além de possuírem sequências amino-terminais e carboxi-terminais que se encontram voltadas para o citoplasma da célula (PAO; PAULSEN; JR, 1998). O transporte de açúcar entre os diversos membros desta família se dá de forma semelhante e, a partir da ligação com um substrato adequado, esses transportadores de açúcar sofrem mudanças de conformação em seus domínios transmembranares, responsáveis pela mudança na orientação do transportador, permitindo que o substrato seja capaz de passar do meio exterior para o interior da célula (KABACK *et al.*, 2011).

¹ Do inglês, *Major Facilitator Superfamily*

Figura 2.3 – Esquematisação da estrutura dos transportadores da família MSF, com 12 segmentos transmembrana. Em A, temos o arranjo dos 12 segmentos transmembrana, conectados por regiões hidrofílicas. Em B, temos a posição dos segmentos no plano da membrana (com representação do substrato pela esfera preta). Em C, temos a esquematização de transporte, evidenciando as mudanças conformacionais que ocorrem durante o transporte do substrato em direção ao citoplasma.



Estrutura dos transportadores - MSF

Fonte: Adaptado de ABRAMSON *et al.* (2003) e Sorgen *et al.* (2002).

Apesar destes transportadores pertencentes a família MSF apresentarem mudanças nas sequências de proteínas primárias, sabe-se que elas compartilham uma estrutura tridimensional semelhante (LAW; MALONEY; WANG, 2009). Desta forma, considera-se que os membros da MSF partilham estruturas conservadas, porém com sequências de aminoácidos diferentes e possuindo, ainda, diferentes afinidades pelo substrato (MADEJ *et al.*, 2013).

A captação de açúcares pelos transportadores podem ocorrer de duas formas: através de difusão facilitada, ocorrendo a favor do gradiente de concentração, onde não há gasto de energia; ou através de transporte ativo, ocorrendo contra ou a favor do gradiente de concentração, havendo gasto de energia. Neste transporte ativo, há o co-transporte do açúcar com um ou mais prótons, que pode ocorrer na mesma direção do açúcar, ou na direção contrária deste, sendo estes simporte e antiporte, respectivamente (LAGUNAS, 1993). Estes transportadores também podem ser classificados de acordo com sua afinidade pelo substrato, possuindo baixa, média ou alta afinidade pelo açúcar (OZCAN; JOHNSTON, 1995).

2.4 METABOLIZAÇÃO DA XILOSE

Diferentemente da *S. cerevisiae*, alguns microrganismos como leveduras e bactérias, são naturalmente capazes de usar pentoses como a xilose como fonte de carbono. Porém, apesar de serem consideradas excelentes fermentadoras de xilose, essas leveduras não possuem as adaptações necessárias para resistir a processos fermentativos em larga escala industrial,

e muitas delas requerem oxigenação controlada para resultarem numa eficiente fermentação (KWAK; JIN, 2017). Em alternativa a isso, técnicas de engenharia metabólica tem sido estudadas a fim de utilizar genes relacionados ao metabolismo de xilose que estão presentes nessas leveduras, a fim de expressá-los de forma heteróloga em cepas de *S. cerevisiae*, podendo ser realizadas por meio de clonagem em plasmídeos recombinantes ou através de recombinação homóloga, acontecendo diretamente no genoma da levedura (MOURO, 2016).

Se tratando especificamente da levedura *S. cerevisiae*, que não possui em seu genoma os genes que codificam transportadores xilose-específicos, esse transporte de xilose se dá através de transportadores de hexoses, como a glicose, uma família de genes chamada família HXT (KRUCKEBERG *et al.*, 1999). Porém, estudos demonstraram que estes transportadores possuem maior afinidade pela glicose, e quando há a presença dos dois açúcares nos meios, a competição pelos transportadores também favorece a glicose, dificultando ainda mais a entrada de xilose na célula (RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM, 2010; PATIÑO *et al.*, 2019).

2.5 TRANSPORTADORES HXT

A internalização dos açúcares em direção ao interior da célula é um passo de extrema importância para a metabolização destes açúcares. Este transporte se dá através de transportadores de açúcares, que são proteínas ancoradas na membrana da célula (LAGUNAS, 1993). Sabe-se que a levedura *S. cerevisiae* possui uma família composta por 18 genes, que vão do *HXT1* até o *HXT17*, além do *GAL2*, que são responsáveis pela codificação de transportadores de hexoses, como a glicose e a galactose (ELBING *et al.*, 2004), e em situações normais, somente alguns destes transportadores realizam a captação de glicose, incluindo os transportadores Hxt1 até o Hxt7, e o Gal2. Estes transportadores possuem diferentes afinidades pela glicose, e realizam este transporte por difusão facilitada, com a expressão destes transportadores sendo modulada pela concentração de glicose no meio extracelular (OZCAN; JOHNSTON, 1995).

Dentre os transportadores Hxt1-Hxt7 e Gal2, podemos separá-los de acordo com a afinidade pela glicose, sendo os transportadores Hxt1 e Hxt3 de baixa afinidade; os transportadores Hxt2, Hxt4 e Hxt5 de média afinidade e os transportadores Hxt6 e Hxt7 de alta afinidade pela glicose (OZCAN; JOHNSTON, 1995), conforme observamos na tabela abaixo:

Tabela 1 – Afinidade dos transportadores Hxt pela glicose

Transportador	Afinidade pela glicose	Expressão dos genes
Hxt1 e Hxt3	baixa afinidade pela glicose	Expressão induzida por altas concentrações de glicose
Hxt2, Hxt4 e Hxt5	média afinidade pela glicose	Os transportadores Hxt2 e Hxt4 são reprimidos em altas concentrações de glicose, enquanto que o Hxt5 é conhecido pela sua expressão ser iniciada quando a glicose é exaurida do meio
Hxt6 e Hxt7	alta afinidade pela glicose	Expressos sob baixa concentração do açúcar e reprimidos em alta concentração de glicose

Fonte: Este trabalho, adaptado de Ozcan e Johnston (1995).

Apesar da possibilidade destes transportadores Hxt realizarem o transporte de xilose, estudos mostram que esse transporte é realizado com uma afinidade muito menor, quando comparada com a glicose (PATIÑO *et al.*, 2019), além do fato de ocorrer a competição pelos transportadores, quando o meio possui uma mistura de glicose e xilose (RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM, 2010), reduzindo ainda mais a internalização de xilose. Por problemas como esses, estudos têm se dedicado em formas de contornar esse problema, como a expressão de transportadores heterólogos de leveduras capazes de fermentar naturalmente a xilose, expressando-os em cepas de *S. cerevisiae*. Ou ainda realizando experimentos a fim de analisar especificamente a capacidade de cada um destes transportadores Hxt de transportar a xilose, por meio de técnicas de sobreexpressão em linhagem hxt-null de *S. cerevisiae* (linhagem esta que possui os genes necessários à metabolização intracelular de xilose, possuindo os genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1* sobreexpressos e com a deleção dos principais genes para o transporte de glicose e/ou xilose [deleção dos genes hxt1 até hxt7, além do gal2 deletado]) (GONÇALVES, 2014), sendo esta última, a técnica abordada neste estudo.

Experimentos realizados por Gonçalves (2014) demonstraram que a sobreexpressão do transportador Hxt1, de baixa afinidade pela glicose, permite o consumo de xilose quando esta está presente no meio juntamente com a glicose, o chamado co-consumo, porém esta atividade não é observada quando há somente a xilose como fonte de carbono no meio. Esta capacidade de permitir este co-consumo de glicose e xilose, demonstrada por alguns transportadores Hxt, é relacionada ao fato destes transportadores sofrerem regulação glicose-dependente, onde estudos demonstram que em baixas concentrações de glicose ou até mesmo na ausência desta hexose no meio, alguns transportadores têm se mostrado suscetíveis a sofrer endocitose e serem posteriormente degradados no vacúolo celular. Da mesma maneira, alguns transportadores também podem ser endocitados e degradados em resposta a altas concentrações de glicose no

meio, ou pela presença de outras fontes de carbono (HOVSEPIAN *et al.*, 2017; O'DONNELL *et al.*, 2015). Em 2015, O'Donnell *et al.* (2015) demonstraram também que genes como o *ROG3*, que codifica a arrestina 7, e o *ROD1*, que codifica a arrestina 4, possuem envolvimento no tráfego de transportadores Hxt. Portanto, ainda que transportadores sejam expressos e/ou sobreexpressos na levedura *S. cerevisiae*, a regulação sofrida pela presença de glicose no meio extracelular ainda é um passo limitante quando se deseja evitar a remoção da membrana e posterior degradação destes transportadores de açúcar.

2.6 ENDOCITOSE DE TRANSPORTADORES

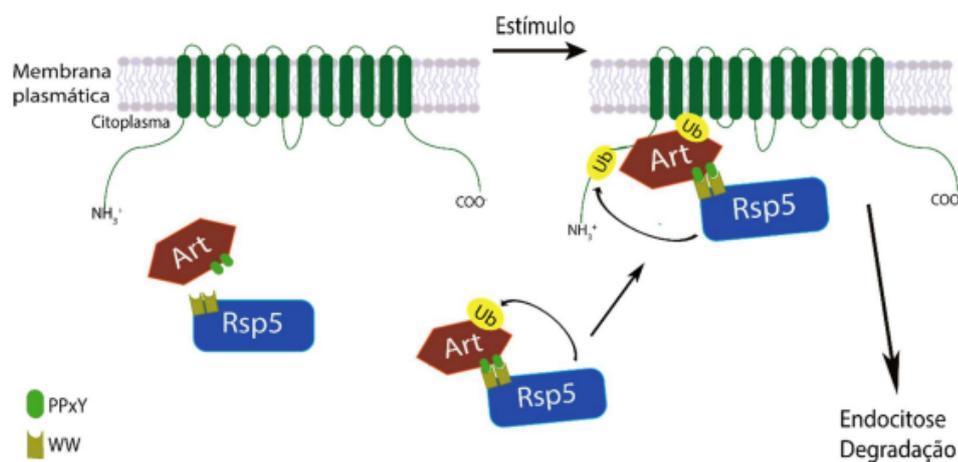
A remoção de proteínas transmembrana em leveduras, como os transportadores de açúcar, por exemplo, ocorre em resposta à concentração de nutrientes ou na exposição a situações de estresse celular. Isso só é possível graças à complexidade da membrana da célula deste microrganismo, capaz de se reorganizar frente a diferentes situações, a fim de manter a homeostase no interior da célula. Durante esse processo de reorganização da membrana, pode ocorrer a junção de moléculas de ubiquitina em resíduos de lisina nos domínios citoplasmáticos das proteínas de membrana, servindo como mecanismo de marcação celular, sinalizando para a ocorrência de endocitose desta proteína e posterior degradação no vacúolo celular (FINLEY *et al.*, 2012). Esse processo de marcação que precede a internalização da proteína, compreende a transferência de uma ou mais moléculas de ubiquitina em resíduos de lisina específicos na proteína alvo, realizadas por um conjunto de enzimas (Enzima ativadora de ubiquitina - E1, Enzima conjugadora de ubiquitina - E2, e Ubiquitina ligase - E3), onde a enzima E3 é responsável por ubiquitinar especificamente a proteína alvo (HORÁK, 2003).

O processo de ubiquitinação de proteínas transmembrana requer, na maior parte dos casos, a atividade da proteína ubiquitina ligase Rsp5, proteína essa que se encontra presente em processos de endocitose de transportadores de açúcar (PAIVA *et al.*, 2009; FINLEY *et al.*, 2012). A Rsp5 contém os domínios WW (região que possui dois resíduos conservados de triptofano), necessários para o reconhecimento dos motivos PPxY (prolina-prolina-x-tirosina), para que ocorra, então, a ligação e a ubiquitinação destes substratos, vide Figura (2.4) (DUNN; HICKE, 2001). Léon e colaboradores (2009) demonstraram que grande parte das proteínas transmembrana não possuem o motivo PPxY e necessitam, então, de proteínas adaptadoras (chamadas α -arrestinas) que possuem esse motivo reconhecido pela Rsp5, e são encarregadas de recrutar a Rsp5 e reconhecer o transportador que será degradado (LÉON; HAGUENAUER-TSAPIS, 2009).

Como dito anteriormente, a endocitose das proteínas transmembrana, como os transportadores de açúcar, ocorre através da mediação de proteínas adaptadoras endocíticas, conhecidas como α -arrestinas ou Arts, que atuam no recrutamento da Rsp5 (NIKKO; SULLIVAN; PELHAM, 2008). Em leveduras, as α -arrestinas totalizam 14 proteínas adaptadoras de Rsp5, e cada uma delas responde a estímulos específicos. O'Donnell *et al.* (2015), demonstraram que os genes *ROD1* (que codifica a Art4) e *ROG3* (que codifica a Art7), têm envolvimento da

endocitose de alguns transportadores de açúcar. Sabendo-se disso, as arrestinas são potenciais focos de estudos, cuja finalidade é o desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* que seja capaz de manter os transportadores de açúcar na sua membrana de forma permanente, a fim de inibir o processo de ubiquitinação, endocitose e a posterior degradação no vacúolo celular.

Figura 2.4 – Esquemática do papel das arrestinas como mediadores da endocitose de transportadores. Os círculos verdes representam os motivos (PPxY) específicos das α -arrestinas que se conectam aos domínios WW (representado na cor ocre), que se encontram na proteína Rsp5, permitindo, então, a ubiquitinação da α -arrestina pela proteína Rsp5 e recrutando-a em direção ao transportador que será ubiquitinado em lisinas citoplasmáticas e posteriormente degradado.



Papel das arrestinas como reguladores da endocitose

Fonte: Adaptado de Polo (2012) e Prosser *et al.* (2015).

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi realizar a deleção dos genes *ROD1* e/ou *ROG3* em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, sobre-expressando o transportador de açúcar Hxt7, cujo objetivo foi analisar o envolvimento destas arrestinas no processo de ubiquitinação do transportador em questão, o Hxt7.

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS

As linhagens de levedura utilizadas encontram-se na Tabela (2).

Tabela 2 – Linhagens de Leveduras utilizadas.

Linhagens	Genótipo ou descrição	Fonte
ASY-3	Isogênica à DLG-K1, mas <i>pho13Δ::LoxPble-LoxP</i>	DOS SANTOS (2017)
ASY-1	Isogênica à CEN.PK2.1C, mas <i>loxP-KanMX-loxP-PADH1::XKS1</i>	DOS SANTOS (2017)
DLG-K1	MATa <i>hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 gal2Δ ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 AUR1::pAUR-XKXDHXR</i>	GONÇALVES et al. (2014)
DLG-K1T7	Isogênica à DLG-K1 + <i>pPGK-HXT7</i>	GONÇALVES et al. (2014)
DLG-K1T7Δrog3	Isogênica à DLG-K1 mas <i>rog3Δ::LoxPble-LoxP</i> + <i>pPGK-HXT7</i>	Este trabalho
DLG-K1Δrog3rod1	Isogênica à DLG-K1, mas <i>rog3Δ::LoxP-Ble^R-LoxP</i> e <i>rod1Δ::LoxP-Kan^R-LoxP</i>	Este trabalho

3.2 MEIOS DE CULTURA

Para o cultivo das células de leveduras, foram utilizados meios ricos YP (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona), meios sintéticos YNB (6,7 g/L de base nitrogenada), meios sintéticos sem uracila (6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos, suplementado com 2 g/L de meio Drop Out sem a base nitrogenada uracila – Sigma Aldrich), ou meios YNB sem uracila otimizado YNB-O-ura⁻ (13,4 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos, suplementado com 15 g/L de casaminoácidos, Sigma Aldrich). Para o preparo de meios sólidos, foi adicionado 20 g/L de ágar. Todos os meios utilizados foram suplementados com as fonte de carbono de interesse (maltose, glicose e/ou xilose) e tiveram o seu pH ajustado para 5,0 com HCl. Quando necessário, os meios foram suplementados com 500 mg/L de Zeocina (Invivogen) ou 200 mg/L de Geneticina (Sigma Aldrich). A esterilização de todos os meios de cultura foi feita através de calor úmido (usando a autoclave a 120 °C durante 15 a 20 min). Para a propagação de plasmídeos, a linhagem da bactéria *Escherichia coli* DH5α foi utilizada, sendo

crescida em meio Lúria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L, extrato de levedura, 5 g/L cloreto de sódio) suplementado com 100 mg/L de Ampicilina.

3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Extração de DNA genômico

Para a realização da extração do DNA das leveduras, foi realizado o pré-crescimento das células em 3 mL de meio líquido YP contendo 20 g/L de maltose como fonte de carbono, por 24 horas a 28 °C, sendo agitados em 160 rpm. Posteriormente, a cultura foi centrifugada (3,000 RPM, 5 min), com descarte do sobrenadante e utilização das células em um kit comercial de extração de DNA de leveduras (YeastStar Genomic DNA Kit™, Zymo Research) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Após isso, o DNA genômico foi ressuspenso em 60 µL de água deionizada (MilliQ) autoclavada, e a amostra foi armazenada em Freezer para ser utilizada posteriormente.

3.3.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para se obter o módulo de deleção, foram aplicadas reações de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)¹. Fez-se, então, o uso da enzima de alta afinidade Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) e o termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf), cujas especificações foram: 50ng de DNA, Tampão Phusion HF® 5x, dNTPs 10nM, 5uM de cada iniciador, 1 U da enzima Phusion e água deionizada para completar o volume para 600 µL. A solução total foi dividida entre 24 tubos Eppendorfs 200 µL (tubos Eppendorf para PCR) contendo 25 µL da mistura em cada tubo. As reações de amplificação do módulo de deleção foram realizadas no termociclador, através das seguintes etapas em sequência: desnaturação inicial de 98 °C durante 20 segundos; 30 ciclos de desnaturação de 98 °C durante 10 segundos; anelamento dos iniciadores com temperatura de 59 °C durante 20 segundos; e etapa de extensão de fitas de 72 °C por 15-30 segundos/Kb; finalizando com um passo final de extensão de 72 °C por 7 min.

Além disso, foram realizadas também reações de PCR para verificar as construções genômicas. Foi utilizada a enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega), com as seguintes condições: 50 ng de DNA, Tampão Green® 5x, dNTPs 200 µM, 5 µM de cada iniciador, 0,75 U da enzima GoTaq® e água deionizada para completar o volume total de 50 µL. Após esse procedimento, foram realizadas reações de verificação no termociclador, seguindo esses passos: desnaturação inicial de 95 °C por 2 min; em seguida, 30 ciclos de desnaturação de 95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores com temperatura de 50 °C por 1 min e etapa de extensão de fitas 72 °C por 30-60 segundos/Kb, finalizando com um passo final de extensão de 72 °C por 2 min.

¹ Do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

3.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Após a obtenção dos fragmentos de DNA através da técnica de PCR, a técnica de eletroforese em gel de agarose foi aplicada. Para isto, o gel foi feito através de uma mistura de 1% de agarose em tampão TBE (45 mM Trisborato, 1mM EDTA em pH 8,0) contendo 2,5 ug/L de brometo de etídio (intercalante de DNA) – sendo o brometo utilizado para análise das bandas de DNA em luz ultravioleta. Depois da obtenção dos fragmentos desejados, aplicou-se 10 μ L (diluídos em tampão de corrida, 6x concentrado) da amostra em poços do gel de agarose e 6 μ L do marcador de peso molecular de 1 kb ladder (BioLabs®), sendo corridos em conjunto em poços paralelos. Após, o gel foi submetido à eletroforese no mesmo tampão TBE, em condições de 100 V por 60 90 min. Ao final do tempo da técnica, o gel foi analisado e fotodocumentado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad).

3.3.4 Obtenção do Módulo de Deleção

Para construir o módulo de deleção, primeiramente foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores Tabela (3), com o auxílio da ferramenta disponibilizada online pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) (www.idtdna.com) e o banco de dados Saccharomyces Genome Database (SGD) (www.yeastgenome.org) - este último sendo empregado para obtenção das sequências de nucleotídeos das regiões de interesse no genoma das leveduras. Os iniciadores para recombinação homóloga foram desenhados para possuírem regiões homólogas a uma região do DNA alvo no genoma da levedura (aproximadamente 40 nucleotídeos), seguidos de uma sequência de aproximadamente 20 nucleotídeos, que permitiu a amplificação do módulo de deleção a partir do DNA da linhagem ASY-1 ou ASY-3. Outros iniciadores foram também desenhados para verificação das recombinações realizadas com o módulo de deleção conforme mostrado na Figura (3.1). Na obtenção do módulo de deleção Kan^R, foi utilizado o DNA extraído da linhagem recombinante (DOS SANTOS, 2017) – linhagem essa que possui o gene Kan^R em seu genoma, conferindo, em leveduras, resistência à Geneticina. No processo de amplificação do gene Kan^R, foram realizadas reações de PCR usando os iniciadores Rec-ROD1-F e Rec-ROD1-R Tabela (3). Foram obtidos fragmentos de DNA linearizados, com aproximadamente 1615pb e contendo o gene Kan^R, tais procedimentos deram origem aos denominados "Módulos de Deleção Kan^R" Figura (3.1), possuindo em suas extremidades regiões de homologia (40 pb) ao começo e ao fim do gene *ROD1*.

Da mesma forma, foi utilizada a linhagem ASY-3 (DOS SANTOS, 2017) para obter-se o módulo de deleção Ble^R que confere, em leveduras, resistência a Zeocina, foram utilizando os iniciadores Rec-ROG3-F e Rec-ROG3-R Tabela (3). Foram obtidos fragmentos de DNA com aproximadamente 1265 pb contendo o gene Bler, chamados então de "Módulo de Deleção Ble^R". Neste caso, os iniciadores utilizados para a amplificação possuem região de homologia ao início e ao final do gene *ROG3*.

3.3.5 Concentração dos fragmentos de DNA amplificados

Posteriormente a confirmação da obtenção dos módulos de deleção gênica, com o tamanho esperado (através da técnica de eletroforese em gel de agarose), os produtos oriundos da amplificação por PCR em 24 tubos (25 μ L cada) foram concentrados num único Eppendorf, por precipitação do DNA, conforme descrito por (AGNOLO, 2014). No tubo contendo os módulos de deleção, foram adicionados 30 μ L de solução 3 M de cloreto de sódio e 750 μ L de etanol absoluto gelado (etanol 100% a -20 °C), sendo, logo em seguida estocado em freezer a -20 °C por cerca de 16 horas. A seguir, o tubo foi centrifugado (10.000 RPM, 15 min, 4 °C), o sobrenadante foi descartado, e o DNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado (a -20 °C). Em seguida, uma nova centrifugação foi realizada (10.000 RPM, 7 min, 4 °C), o sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido em capela de fluxo laminar por 30 min, para a completa secagem do etanol remanescente no tubo. Por fim, foi feita a ressuspensão do DNA precipitado dos 24 tubos de PCR em 50 μ L de água deionizada estéril, e a solução contendo o módulo de deleção foi mantida a -20 °C até sua utilização para transformação das linhagens.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores e plasmídeo utilizado.

Iniciador	Sequência	Referência
Recombinação		
Rec-ROG3-F	GGCGTTGATAAAGAGCCAAT ATCTATTGTTGCTACATAGA CCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Este trabalho
Rec-ROG3-R	CGACTATCGTTTGTACCCT TTGATAGAAAACCTCCCATA GCATAGGCCACTAGTGGATC	Este trabalho
Rec-ROD1-F	ATGTTTTTCATCATCTCG ACCTTCAAAAAGAGCCATTAC CCAGCTGAAGCTTCGTACGC	LBMBL
Rec-ROD1-R	CTATGAGCGATCCCGTTTTG TGAACATCTCCATTAATA GCATAGGCCACTAGTGGATC	LBMBL
Verificação		
V-ROG3-F	GCAAGTACAGAGTCCTACCA	Este trabalho
V-ROG3-INT-F	CTGTGTGCAAGATTGTGATG	Este trabalho
V-ROG3-R	GCCAGTTAGAGTGCGTAAAT	Este trabalho
V-Ble ^R -F	CCTTCTATGAAAGGTTGGGC	Dall Agnolo (2014)
V-ROD1-F	AGTCGAGTCCCTTGGTACAT	LBMBL
V-ROD1-INT-F	CTGCCGTCACCTTATGCTCTG	LBMBL
V-ROD1-R	CGAATGATGTCTGTGGGATC	LBMBL
pPGK-seq-F	CAGATCATCAAGGAAGTAAT TATCT	Sales (2015)
tPGK-seq-R	TCTATCGATTTCAATTCAAT TCAAT	Sales (2015)
Plasmídeo		
Plasmídeo	Genótipo	Fonte
pPGK-HXT7	URA3 PGK1p-HXT7-PGK1t	Gonçalves (2014)

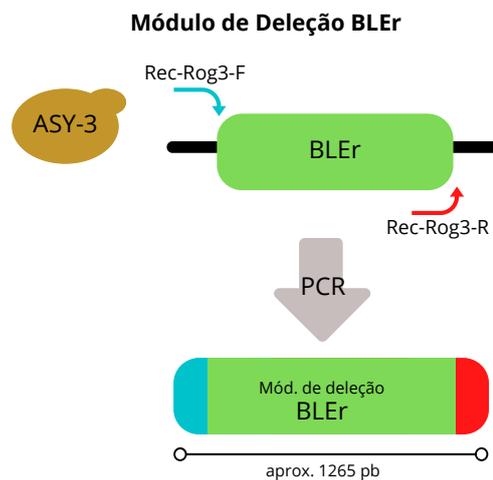
Fonte: LBMBL - Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras.

3.3.6 Transformação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

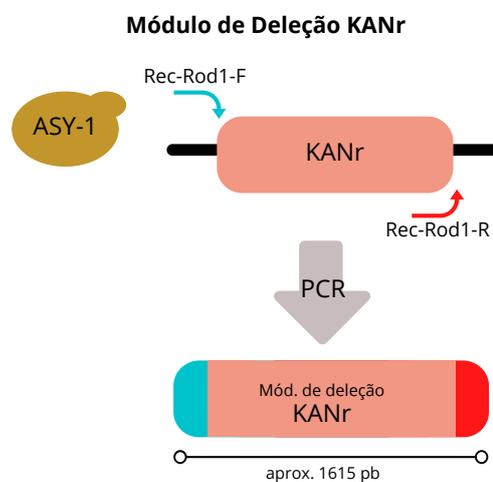
A transformação da levedura foi realizada seguindo a metodologia descrita por (GIETZ; WOODS, 2006). Inicialmente, as linhagens de interesse foram pré-crescidas em meios YP contendo 20 g/L de maltose como fontes de carbono em um volume de 3 mL. Logo após isso, 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um frasco YP com 20 g/L de maltose. O

meio de cultura foi incubado a 28 °C e 160 rpm, até atingir a absorbância (ABS600nm) de aproximadamente 1. Logo após, 9 mL da cultura foram centrifugados (3000 RPM, 5 min), lavados com água destilada estéril, tendo seu sobrenadante descartado, e com suas células sendo delicadamente ressuspensas em 300 μ L de solução TE/AcLi (110 μ L de solução de 1 mM de EDTA e tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 110 μ L acetato de lítio 1 M e 780 μ L H₂O miliQ estéril).

Figura 3.1 – Construção dos módulos de deleção Ble^R e Kan^R . Iniciadores contendo regiões de homologia à região no início (em azul) e no fim (em vermelho) do gene $ROG3$ (na primeira imagem) ou do gene $ROD1$ (na segunda imagem) e que possuem, também, regiões complementares ao início e ao fim do gene Kan^R (em salmão) ou ao início e ao fim do gene Ble^R (em verde) produziram, por reação de PCR com o DNA extraído das leveduras $ASY-3$ ou $ASY-1$, fragmentos lineares de DNA linearizados utilizados como módulos de deleção.



(a) Módulo de deleção Ble^R .



(b) Módulo de deleção Kan^R .

Fonte: Este trabalho.

Posteriormente, cerca de 50 μ L dessa suspensão celular com TE/AcLi foram adicionadas a um novo tubo Eppendorf e foram adicionados 5 μ L de DNA de fita simples (10 g/L - 1 de DNA de esperma de salmão, previamente incubado em banho-maria a 100 °C por 5 min e resfriado imediatamente em banho de gelo), 50 μ L de solução contendo o módulo de deleção concentrado ou o plasmídeo, além de 340 μ L de solução PEG/AcLi (125 μ L de solução de 1 mM de EDTA e tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 125 μ L acetato de lítio 1 M e 1 mL de polietileno glicol a 50%). Logo após, os tubos foram incubados a 30 °C por 30 min com agitação de 160 rpm. As suspensões celulares foram então agitadas levemente e, logo após, foram incubadas em banho-maria a 42° por 30 min, agitando gentilmente a cada 5 minutos.

A seguir, os tubos foram centrifugados (3000 RPM, 2 min) e o sobrenadante foi descartado. Logo após, um volume de 1 mL de meio YP contendo 20 g/L de maltose foi adicionado aos tubos para ressuspender gentilmente as células. Os tubos foram incubados a 28 °C por 90 min, sob agitação de 160 rpm, e depois foram centrifugados (3000 RPM, 2 min), sendo o sobrenadante descartado. Houve a ressuspensão das células em 200 μ L de água destilada estéril, e foram inoculadas na superfície de placas de Petri com meios mínimos YNB contendo 20 g/L de maltose (no caso dos plasmídeos), ou meio YP contendo 20 g/L maltose junto com 500 mg/L de zeocina ou 200 mg/L de Geneticina (no caso dos Módulos de deleção). As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C de 3 a 5 dias, até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que tiveram sucesso no crescimento foram replicadas para novas placas, contendo o mesmo tipo de meio e condições de cultivo utilizados anteriormente. Sendo assim, após o crescimento, as células foram utilizadas para confirmar as modificações no genoma dessas linhagens através de técnicas de PCR com iniciadores de verificação e eletroforese.

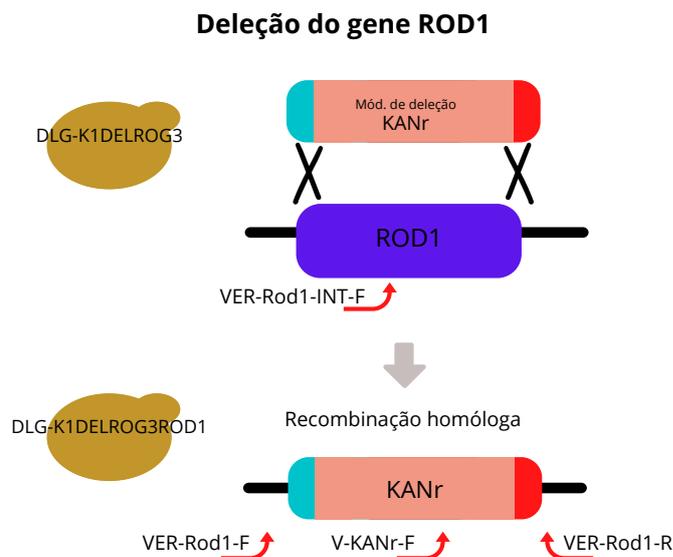
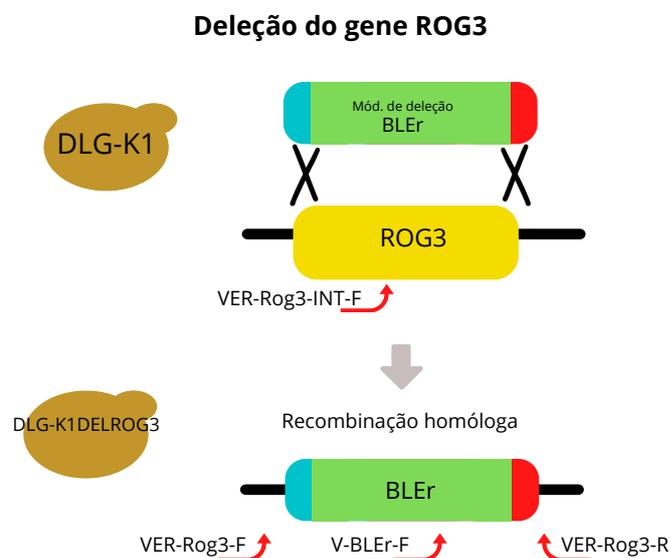
3.3.7 Deleção dos genes *ROD1* e *ROG3*

Como apresentado anteriormente, as modificações nas linhagens foram realizadas através do procedimento de recombinação homóloga. Seguindo essa metodologia, primeiramente o gene *ROG3* foi deletado da linhagem DLG-K1. Para tal, os fragmentos linearizados de DNA denominados “Módulos de deleção Ble^R” foram inseridos, por meio de técnica de recombinação homóloga, no local do gene *ROG3* na linhagem DLG-K1. As linhagens recombinantes foram selecionadas em placas de Petri com meio de cultivo contendo Zeocina. A confirmação da transformação se deu através de reações de PCR com os iniciadores V-ROG3-F, V-ROG3-INT-F, V-ROG3-R e V-Ble^R-F (Tabela (3)).

Um procedimento similar foi utilizado para a deleção do gene *ROD1* na cepa já anteriormente deletada no gene *ROG3*, porém utilizando um módulo diferente, o “Módulo de Deleção Kan^R”, que será inserido no local do gene *ROD1*, por recombinação homóloga, na linhagem DLG-K1 Δ rog3, originando a linhagem duplo-deletada DLG-K1 Δ rog3 Δ rod1. As linhagens recombinantes foram selecionadas em meio de cultivo contendo Geneticina, e a confirmação da transformação se deu através de reações de PCR com os iniciadores V-ROD1-F, V-ROD1-INT-F,

V-ROD1-R e V-Kan^R-F Tabela (3).

Figura 3.2 – Deleção dos genes *ROG3* e *ROD1*. Os fragmentos de DNA linearizados “Módulo de Deleção Ble^R” (primeira imagem) e “Módulo de Deleção Kan^R” (segunda imagem) contendo regiões de homologia a região no início (azul) e no fim (vermelho) dos genes *ROG3* e/ou *ROD1*, que por recombinação homóloga, substituíram esses genes pelos genes Ble^R ou Kan^R.



Fonte: Este trabalho.

3.3.8 Extração de DNA plasmidial (Mini-Prep)

O protocolo de lise alcalina foi utilizado para realizar a extração dos plasmídeos das bactérias (AUSUBEL *et al.*, 1989). Primeiramente, as bactérias foram inoculadas em 3 ml de meio LB com ampicilina, e incubadas por 16 h. Transfere-se, então, 1,5 ml da cultura para um microtubo, centrifugando a 5000 RPM durante 4 min. A seguir, o pellet é ressuspenso em 100 μ L de Solução I (0,9 g de glicose, 2,5 mL de Tris-Hel 1 M pH 8, 2 mL de EDTA 0,5 M, em 100 mL de água bi-destilada, sendo a seguir autoclavado). A seguir, adiciona-se 1 mL de RNase 1 mg/mL, homogeneizando suavemente e deixando descansar em temperatura ambiente. Posteriormente, adiciona-se 200 μ L de Solução II (200 mL de NaOH 1M, 2 mL de SDS 20%, 775 mL de dH₂O), agitando gentilmente, deixando por 5 min no gelo. Adiciona-se então 150 μ L da Solução III (0,49 g de acetato de potasio, 10 mL de água bi-destilada, com o pH ajustado para 4,8), deixando 5 min no gelo. A seguir, centrifuga-se a 13000 RPM, a 4 °C por 10 min. Transfere-se o sobrenadante para um novo microtúbulo. Adiciona-se 20 μ L de NaCl 3M e 800 μ L de etanol 100% gelado, deixando-se por 3 h no freezer. Centrifuga-se, então, por 20 min a 13000 RPM a 4 °C e descarta-se o sobrenadante. Seca-se o DNA plasmidial na câmara de fluxo por aproximadamente 30 min e por fim, ressuspende-se em 50 μ L de água bi-destilada estéril.

3.3.9 Ensaios fermentativos com as linhagens de levedura

Para os ensaios fermentativos das leveduras, as cepas foram pré-crescidas em meios mínimos YNB-Oura- com 20 g/L de maltose, até a fase exponencial. Em seguida, as células foram centrifugadas (3500 rpm durante 3 min) e lavadas duas vezes com água fria, sendo inoculadas em meio mínimo YNB-Oura⁻ com glicose ou xilose, com uma absorvância inicial a 600 nm de 1,5. As fermentações foram realizadas a temperatura de 28°C em frascos fechados de 50 mL, preenchidos com 20 mL de meio de cultura, e mantidos com agitação por barra magnética, permitindo uma suave agitação. Amostras foram coletadas em tempos previamente determinados, para medida da absorvância a 600 nm da cultura, bem como os sobrenadantes foram recolhidos para posterior análise de consumo de açúcares e produção de metabólitos.

3.3.10 Determinação dos substratos e produtos das fermentações

A partir das amostras retiradas durante os ensaios fermentativos, foram determinadas as concentrações de glicose, xilose, etanol e glicerol, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), no equipamento LC-20A Shimadzu, usando as seguintes condições: coluna Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel com ácido sulfúrico 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min durante 30 min, temperatura da coluna de 50°C e detecção dos compostos por índice de refração (IR). As curvas de calibração foram estabelecidas a partir do uso de seis concentrações diferentes de glicose, xilose, etanol e glicerol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi realizar a deleção do gene *ROG3* e a dupla-deleção dos genes *ROD1* e *ROG3*, que codificam as arrestinas Art4 e Art7, respectivamente, e analisar os efeitos dessa deleção em cepas de *S. cerevisiae hxt-null* linhagem com sobreexpressão dos genes responsáveis para a metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*), e com os principais genes que codificam para os transportadores de hexoses deletados (genes *HXT1*, *HXT2* e *GAL2*), sobre-expressando o transportador Hxt7 (transportador de alta afinidade pela glicose), com o objetivo de entender como estas duas α -arrestinas atuam na endocitose dos transportadores de açúcares da levedura.

Em relação aos transportadores Hxts, um estudo demonstrou que a α -arrestina Rog3 (Art7) aparenta ser uma das arrestinas necessárias para o recrutamento do complexo proteico RSP5, que é responsável pela ubiquitinação desses transportadores. (O'DONNELL *et al.*, 2015) verificaram que os genes *ROD1* e *ROG3*, que respectivamente codificam as arrestinas Art4 e Art7, se encontram envolvidos no tráfego dos transportadores como o Hxt1 e o Hxt3. Ademais, têm-se observado que transportadores que possuem alta afinidade pela glicose, como os transportadores Hxt6 e Hxt7, são removidos da membrana e endocitados na presença de altas concentrações de glicose, ou quando há ausência de glicose (HOVSEPIAN *et al.*, 2017).

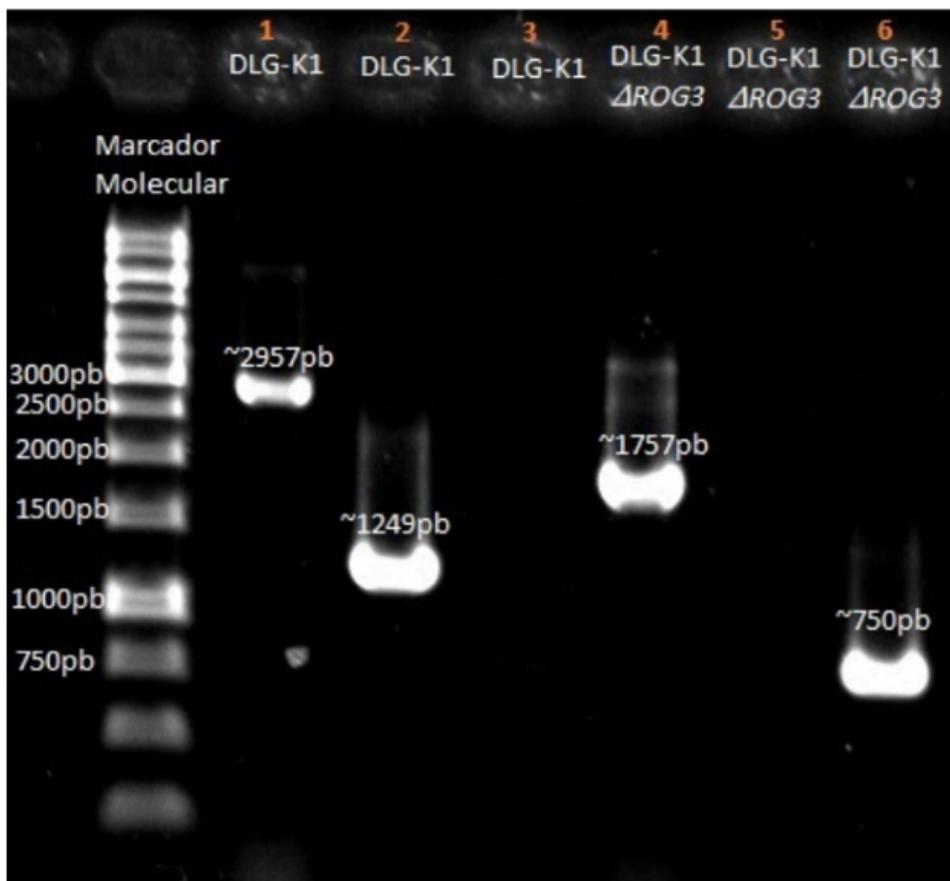
A partir do enfoque em somente uma das arrestinas, a Art7 (gene *ROG3*), foi desenvolvida uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae*, a partir da deleção o gene *ROG3* na linhagem de *hxt-null* DLG-K1. Para isso, foram construídos módulos de deleção (fragmentos de DNA lineares), que foram amplificados através de PCR, a partir da linhagem de laboratório de *S. cerevisiae* ASY-3 (DOS SANTOS, 2017). Após a recombinação homóloga, usando a linhagem DLG-K1 e o Módulo de Deleção Ble^R , deu-se origem a linhagem recombinante DLG-K1 Δ rog3 (Figura (3.2)).

A confirmação desta deleção pode ser verificada pela análise de gel de agarose das reações de PCR, fazendo uso do DNA extraído da linhagem recombinante DLG-K1 Δ rog3 e iniciadores construídos especialmente para a sua verificação Tabela (3). Observando a Figura (4.1), é possível verificar que utilizando os iniciadores V-ROG3-F e V-ROG3-R (que hibridizam o montante e a jusante do gene *ROG3*, respectivamente), em reações de PCR utilizando o DNA da levedura parental (DLG-K1), foi possível a amplificação de um fragmento linear de aproximadamente 2957pb (linha 1), compatível com a presença do gene *ROG3* no genoma dessa linhagem de levedura. Quando foram utilizados os mesmos iniciadores e o DNA da linhagem DLG-K1 Δ rog3, foi verificada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1757pb (linha 4), indicando a integração correta do módulo de deleção no genoma da levedura recombinante, já que o gene Ble^R é menor que o gene *ROG3*.

Utilizando os iniciadores V-ROG3-INT-F e V-ROG3-R (que se ligam no interior do gene e a jusante ao gene *ROG3*, respectivamente) em reações de PCR, usando o DNA da levedura parental DLGK1, foi possível obter um fragmento de 1249 pb (linha 2), compatível com a

presença do gene *ROG3* no genoma dessa linhagem de levedura. Quando foram utilizados os mesmos iniciadores com o DNA da linhagem *DLG-K1Δrog3*, observa-se a ausência de amplificação (linha 5), comprovando, novamente, a deleção do gene *ROG3* na linhagem recombinante.

Figura 4.1 – Confirmação da deleção do gene *ROG3* com *Ble^R* através de fragmentos de DNA obtidos por PCR com iniciadores específicos. Gel de agarose mostrando: marcador molecular 1 kb Fermentas; linhas 1 e 4 (utilizando os iniciadores V-*ROG3*-F e V-*ROG3*-R); linhas 2 e 5 (iniciadores V-*ROG3*-INT-F e V-*ROG3*-R); linhas 3 e 6 (iniciadores V-*BLE*-F e V-*ROG3*-R).



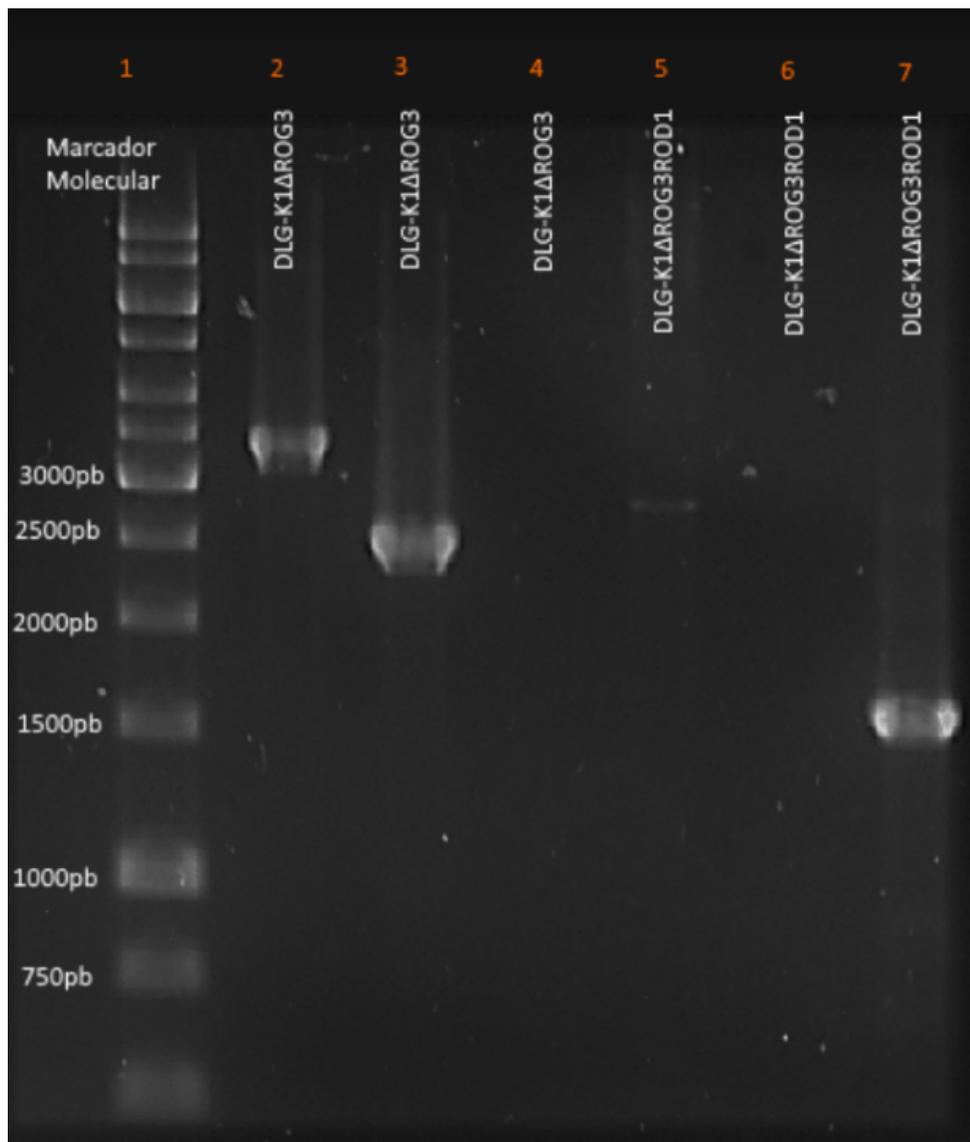
Fonte: Este trabalho.

Foi utilizado, também, o par de iniciadores V-*BLE*-F e V-*ROG3*-R (que hibridizam dentro do gene de resistência *Ble^R* e a jusante do gene *ROG3*, respectivamente), sendo que quando foi utilizado o DNA da levedura parental *DLG-K1*, como esperado não houve nenhuma amplificação Figura (4.1). Por outro lado, os mesmos iniciadores amplificaram um fragmento de aproximadamente 750 pb a partir do DNA da linhagem *DLG-K1Δrog3* (linha 6), confirmando novamente a presença do módulo no genoma dessa linhagem substituindo o gene *ROG3*.

Este trabalho também se propôs a realizar a dupla deleção dos genes *ROD1* e *ROG3* na levedura *hxt-null* *DLG-K1*, a fim de verificar se a deleção dos dois genes influenciariam na estabilidade do transportador HXT7 na levedura. Para isto, a cepa previamente contruída e deletada no gene *ROG3* (linhagem *DLG-K1Δrog3*) foi utilizada para deletar o gene *ROD1* com

o Módulo de deleção Kan^R, como descrito no Capítulo 3. A confirmação dessa dupla deleção pode ser observada na Figura (4.2), que segue o mesmo raciocínio mostrado na Figura (4.1).

Figura 4.2 – Confirmação da deleção do gene *ROD1* na linhagem DLG-K1Δrog3 com Kan^R, através de fragmentos de DNA obtidos por PCR com iniciadores específicos, produzindo a linhagem DLG-K1Δrog3Δrod1. Gel de agarose mostrando: marcador molecular 1 kb Fermentas (linha 1); linhas 2 e 5 fragmentos obtidos com os iniciadores V-ROD1-F e V-ROD1-R; linhas 3 e 6 com os iniciadores V-ROD1-INT-F e V-ROD1-R; e linhas 4 e 7 com os iniciadores V-KAN-F e V-ROD1-R.

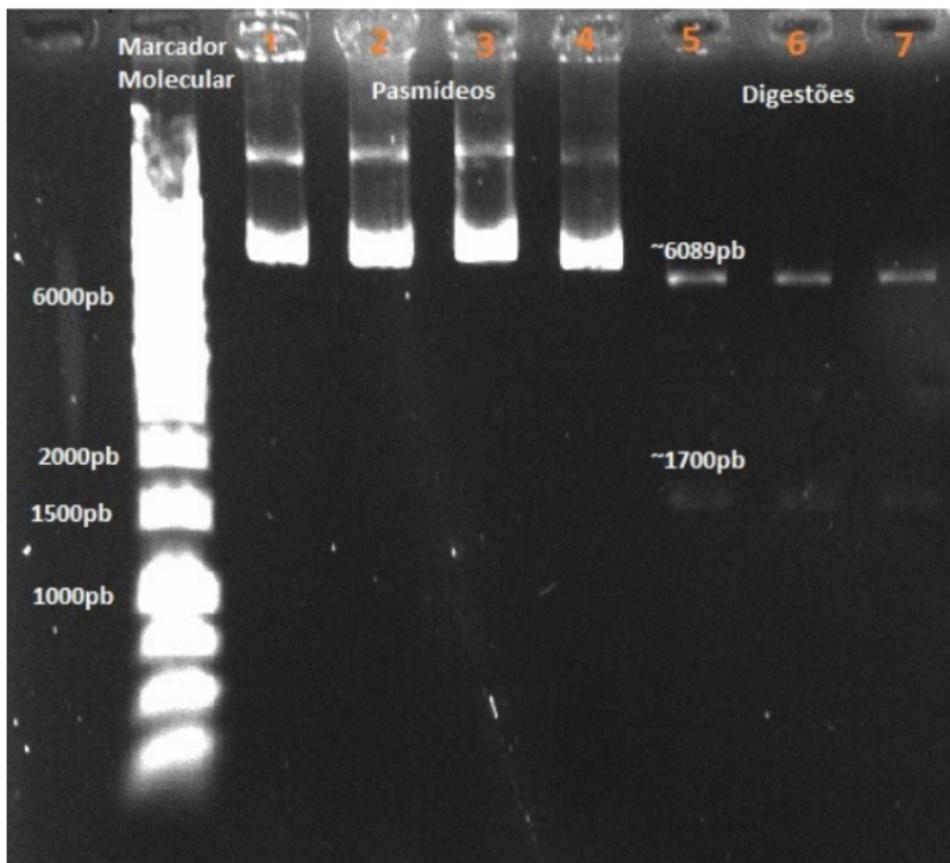


Fonte: Este trabalho.

No entanto, e apesar de termos tido sucesso na deleção dos dois genes *ROD1* e *ROG3*, foi verificado que a linhagem DLG-K1Δrog3Δrod1 tinha seu crescimento significativamente afetado (reduzido), inclusive quando uma fonte de carbono considerada “controle” (maltose) foi utilizada. Neste caso a levedura foi transformada com transportadores heterólogos *XUT1* de *Spathaspora passalidarum* ou *Sp. arborariae* (KNYCHALA, 2017). Nesse trabalho foi verificado

que as melhores estratégias para expressar transportadores heterólogos de xilose era a remoção das lisinas ubiquitináveis nos domínios C- ou N-terminal dos transportadores, enquanto que a linhagem DLG-K1 Δ rog3 permitiu uma melhora no crescimento apenas em glicose nas células expressando o transportador *XUT1* de *Sp. passalidarum* (mas não com o transportador *XUT1* de *Sp. arborariae*). Como a linhagem duplo-deletada já se mostrou ineficiente em uma fonte de carbono controle, optou-se por não realizar a fermentação desta linhagem neste presente trabalho.

Figura 4.3 – Digestão com enzimas de restrição, realizadas a partir do mini-prep, para verificação e confirmação do plasmídeo.

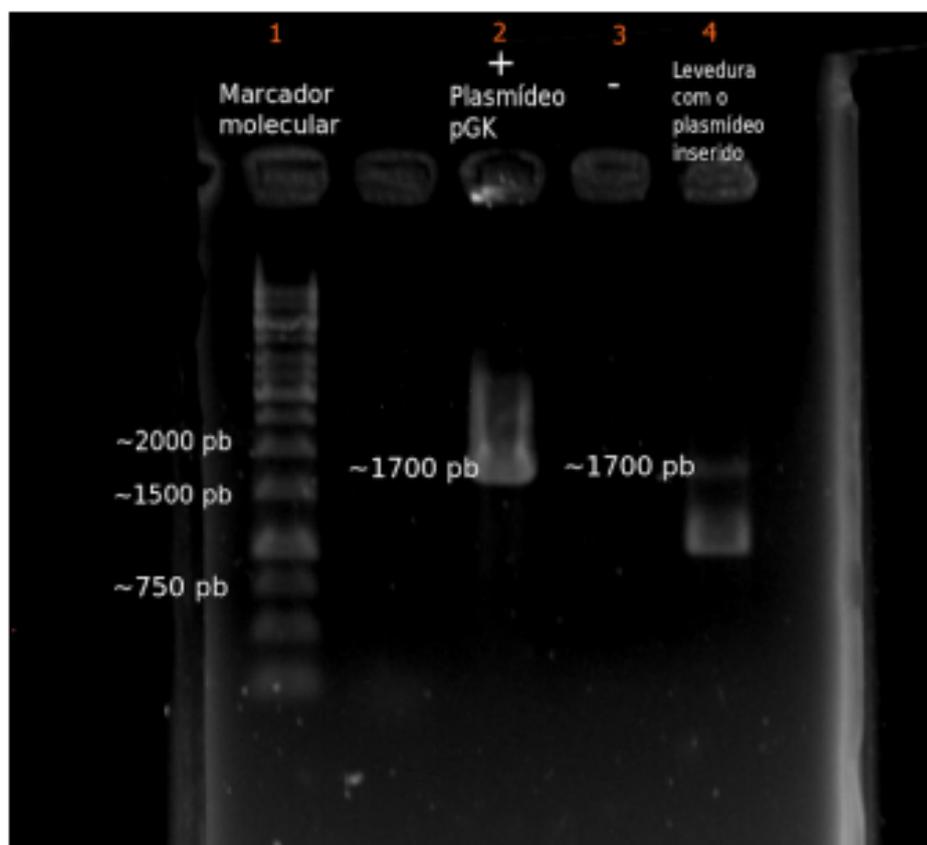


Fonte: Este trabalho.

Na Figura (4.3) é mostrada uma eletroforese do plasmídeo pPGK-HXT7 (que contém o gene *HXT7*), antes e após a hidrólise com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* (utilizadas para inserir o gene *HXT7* no plasmídeo pPGK, vide Gonçalves (2014)). Nesta figura é possível observar uma banda de cerca de 1,700 pb (correspondente ao gene *HXT7*), e um fragmento de aproximadamente 6,089 pb (correspondendo ao plasmídeo linearizado) após a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, confirmando a estrutura esperada para este plasmídeo. A seguir, o mesmo foi inserido na nova levedura construída DLG-K1 Δ rog3, e a Figura (4.4) mostra a confirmação da presença do plasmídeo pPGK-HXT7 na linhagem DLG-K1T7 Δ rog3. Neste caso foram usadas reações de PCR para confirmar a presença do plasmídeo na levedura,

utilizando os iniciadores pPGK-seq-F e tPGK-seq-R Tabela (3) que anelam na região promotora e terminadora do gene *PGK1*, responsáveis pela sobre-expressão do gene *HXT7* no plasmídeo pPGK-HXT7. É importante salientar que no caso da linhagem contendo o plasmídeo pPGK-HXT7, além de obtermos o fragmento esperado de 1,700 pb (gene *HXT7* do plasmídeo), foi obtida uma banda inespecífica, possuindo entre 1,000 e 1,300 pb.

Figura 4.4 – Confirmação da construção genômica em gel de agarose: Confirmação da inserção do plasmídeo pGK na linhagem DLGK1T7. No gel de agarose: coluna 1 (marcador molecular 1kb Fermentas); coluna 2 (plasmídeo pGK de 1700pb); coluna 3 (levedura parental - controle negativo, que não apresenta o plasmídeo), coluna 4 (levedura com plasmídeo inserido, com fragmento de 1700pb).



Fonte: Este trabalho.

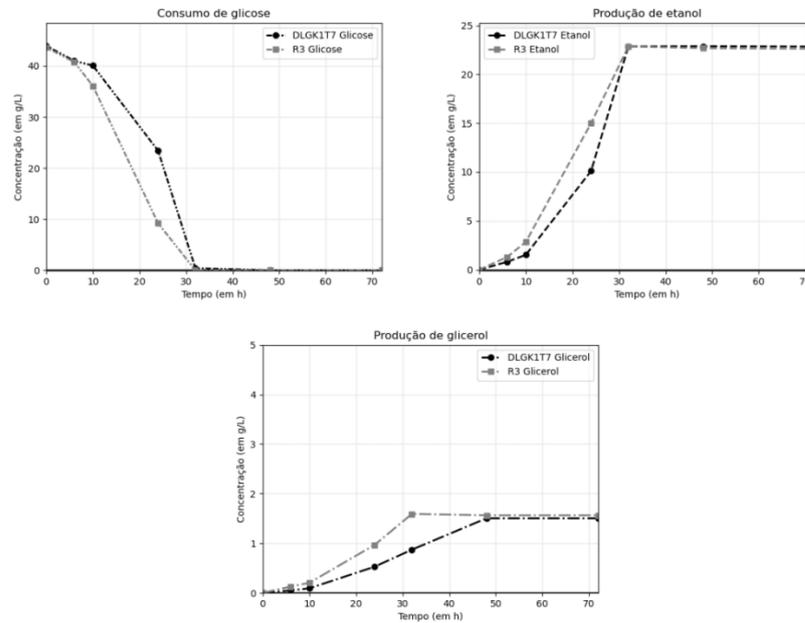
A fim de verificar as mudanças nas performances fermentativas com glicose e/ou xilose provocadas pela transformação desta levedura, foram realizadas fermentações de glicose e/ou xilose e analisado o consumo dos açúcares e a produção de metabólitos das linhagens de leveduras tanto parental (DLG-K1T7) como da linhagem recombinante DLG-K1T7 Δ rog3. Como podemos observar na Figura (4.5), a cepa deletada no gene *ROG3* e com o transportador Hxt7 sobre-expresso apresentou uma melhora no consumo de glicose, quando comparada a sua linhagem parental não-deletada no gene *ROG3*. Ademais, é possível notar que a produção de etanol e glicerol foi mais rápida, principalmente nas 24-30 h iniciais do ensaio. Esse resultado sugere, então, que a ausência dessa arrestina pode ter sido responsável pela maior permanência

do transportador HXT7 na membrana celular no meio contendo 40 g/L glicose, uma condição que sabidamente promove a ubiquitinação e endocitose deste transportador (KRAMPE *et al.*, 1998; LLOPIS-TORREGROSA *et al.*, 2016). Na análise da co-fermentação de ambos os açúcares (glicose e xilose), é perceptível, novamente, uma melhora no consumo de glicose pela linhagem recombinante DLG-K1T7 Δ rog3 em relação à sua parental Figura (4.6). Neste caso, nota-se também uma leve melhora no consumo de xilose (ainda que toda a xilose não tenha sido totalmente consumida por nenhuma das cepas) e também uma melhora na produção de etanol.

Considerando que o transportador Hxt7 é endocitado também na ausência de glicose (e presença de outra fonte de carbono) (HOVSEPIAN *et al.*, 2017), foi analisada a performance fermentativa das linhagens na presença de xilose. Porém, quando observamos os dados obtidos na fermentação de somente xilose como fonte de carbono, percebe-se um desempenho semelhante entre as linhagem parental e deletada no *ROG3* Figura (4.7), sendo que nesta última ainda sobrou xilose ao fim da fermentação, contrariando uma das hipóteses levantadas neste trabalho.

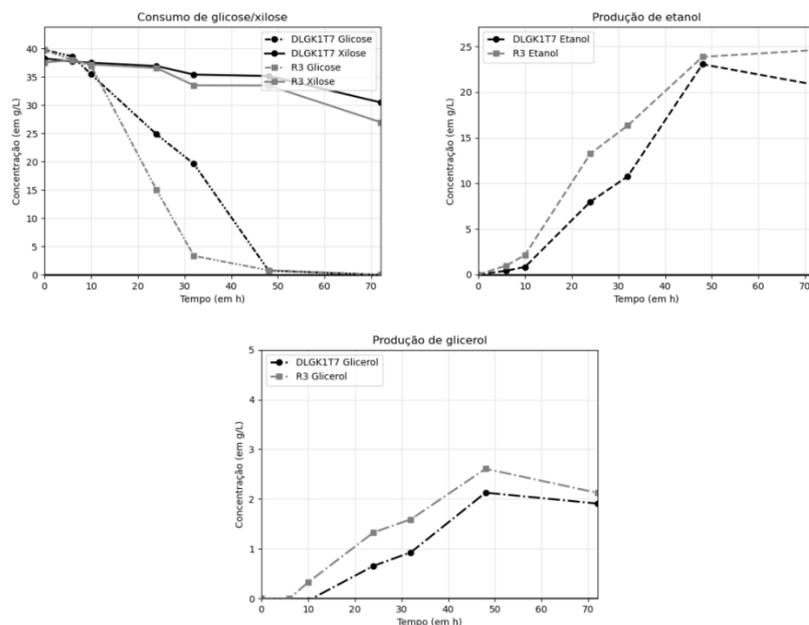
Os resultados positivos observados na cepa recombinante DLG-K1T7 Δ rog3 em relação ao consumo de glicose são interessantes, visto que os transportadores de alta afinidade por glicose, como o Hxt7, são conhecidos por serem endocitados e degradados em meios com alta concentração de glicose (LLOPIS-TORREGROSA *et al.*, 2016). Além disso, a deleção da α -arrestina Art7 (gene *ROG3*) já foi relacionada, em outros estudos, como sendo capaz de manter o transportador Hxt6 (de alta afinidade por glicose e muito semelhante ao Hxt7) em membranas de células de *S. cerevisiae* quando em alta concentração de glicose (NIKKO; SULLIVAN; PELHAM, 2008). Os resultados também vão ao encontro ao observado quando o transportador Xut1 de *Sp. passalidarum* é expresso em *S. cerevisiae*: o consumo e fermentação da glicose é incrementada na linhagem deletada na α -arrestina *ROG3*, mas não foi observado uma melhora no consumo de xilose pela linhagem DLG-K1 Δ rog3 expresando este transportador (KNYCHALA *et al.*, 2021), indicando que as α -arrestinas envolvidas na endocitose do transportador Hxt7 na presença de altas concentrações de glicose, são provavelmente diferentes quando a fonte de carbono é a xilose.

Figura 4.5 – Fermentação aeróbia das linhagens DLG-K1T7 (símbolos pretos) e DLG-K1T7 Δ rog3 (símbolos cinza) em meios sintéticos sem uracila contendo 4% de glicose como fonte de carbono. Nas figuras estão apresentados o consumo de glicose, e a produção de etanol e glicerol.



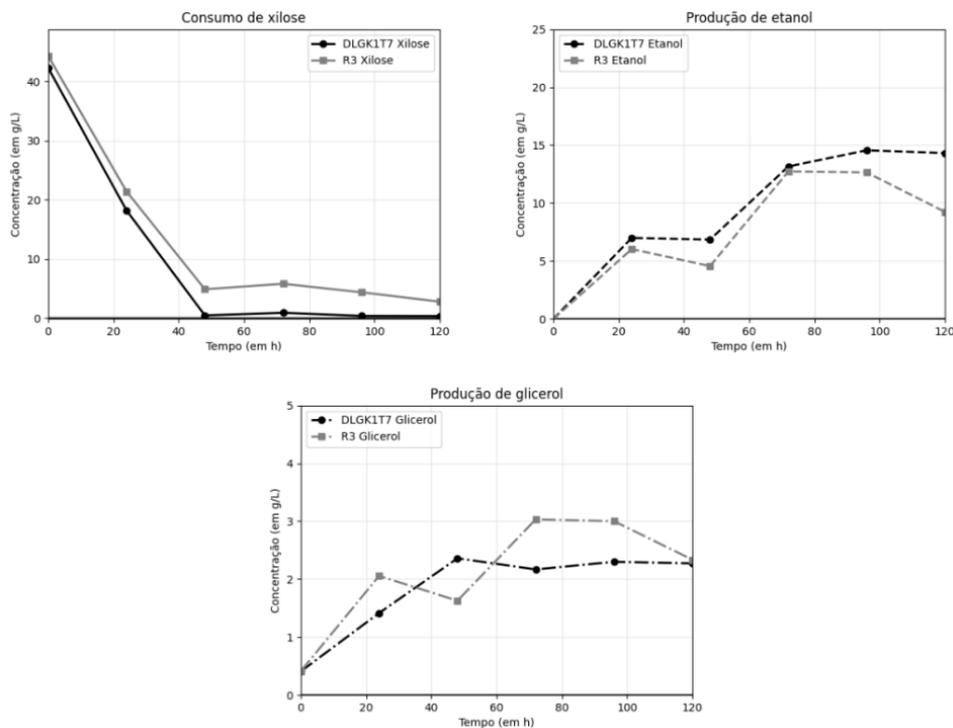
Fonte: Este trabalho.

Figura 4.6 – Co-fermentação de 4% glicose e 4% xilose pelas linhagens DLG-K1T7 (símbolos pretos) e DLG-K1T7 Δ rog3 (símbolos cinza). Nas figuras estão apresentados o consumo dos açúcares, e a produção de etanol e glicerol.



Fonte: Este trabalho.

Figura 4.7 – Fermentação aeróbia das linhagens DLG-K1T7 (símbolos pretos) e DLG-K1T7 Δ rog3 (símbolos cinza) em meios sintéticos sem uracila contendo 4% de xilose como fonte de carbono. Nas figuras estão apresentados o consumo de xilose, e a produção de etanol e glicerol.



Fonte: Este trabalho.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos da fermentação.

Linhagem	Condição Fermentativa	Xilose Consumida (g/L /h)	Glicose Consumida (g/L /h)	Etanol produzido (g/L /h)	Glicerol produzido (g/L /h)
DLG-K1	Glicose	-	0,88	0,44	0,02
DLG-K1 Δ rog3	Glicose	-	1,51	0,66	0,04
DLG-K1	Xilose	0,87	-	0,14	0,04
DLG-K1 Δ rog3	Xilose	0,82	-	0,09	0,02
DLG-K1	Glicose + Xilose	0,08	0,67	0,37	0,03
DLG-K1 Δ rog3	Glicose + Xilose	0,12	1,22	0,57	0,06

Fonte: Este trabalho.

Na Tabela (4) são apresentados os dados referentes à velocidade de consumo dos açúcares e de produção de metabólitos tanto pela linhagem parental DLG-K1T7 como pela linhagem deletada DLG-K1T7 Δ rog3 nas 24 h iniciais das fermentações. Os resultados obtidos confirmam que em fermentações com glicose e na co-fermentação de glicose e xilose, a cepa

deletada no *ROG3* se mostra mais eficiente; porém, quando em meio contendo somente a pentose xilose como fonte de carbono, a cepa deletada no *ROG3* se mostra menos eficiente em relação a sua parental.

5 CONCLUSÕES

Como já mencionado, apesar das grandes expectativas em relação ao futuro promissor no uso da biomassa lignocelulósica para produção eficiente de etanol 2G, sabe-se que o processo de desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar a xilose, principalmente de modo viável econômica e industrialmente, ainda possui vários problemas a serem solucionados. Dentre esses problemas, se encontra principalmente a necessidade de aperfeiçoamento na captação da pentose xilose, como também o aumento da eficiência intracelular da sua rota metabólica.

Além disso, há também limitações em relação à prevenção da degradação do(s) transportador(es) responsável(is) pela captação deste açúcar. Essa degradação se dá através de um processo envolvendo ubiquitinação, com posterior endocitose do transportador e degradação no vacúolo (HORÁK, 1997).

Neste trabalho, usando técnicas de engenharia genômica e transformação de leveduras com plasmídeos, analisamos a influência da α -arrestina Art7 (gene *ROG3*) na fermentação de glicose e/ou xilose por uma levedura contendo apenas o transportador de alta afinidade Hxt7. Os resultados permitem concluir que:

- A deleção do gene *ROG3* (arrestina Art7) permitiu um melhor consumo da glicose durante a fermentação desta fonte de carbono, ou durante co-fermentações glicose/xilose, pela levedura expressando apenas o transportador Hxt7, sugerindo que o gene *ROG3* estaria envolvido na endocitose e remoção do transportador Hxt7 em altas concentrações de glicose, também durante a cofermentação.
- Nenhum efeito positivo pode ser observado na fermentação de xilose (em meios contendo somente xilose como fonte de carbono) pela ausência da arrestina Art7 na linhagem com expressão do transportador Hxt7.
- A dupla-deleção dos genes *ROG3* e *ROD1* não trouxe efeitos positivos no crescimento celular em diferentes fontes de carbono, o que limitou o uso desta linhagem duplo deletada nos ensaios de fermentação.

REFERÊNCIAS

ABRAMSON; SMIRNOVA; KASHO; VERNER; KABACK; IWATA. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. **Science**, v. 30, p. 610–615, 2003.

AGNOLO, DALL. **Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em *Saccharomyces cerevisiae***. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/128954>. Acesso em: 21 ago. 2021.

AMORIM; LOPES; OLIVEIRA; BUCKERIDGE; GOLDMAN. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, p. 1267–75, 2011.

AUSUBEL; BRENT; KINGSTON; MOORE; SEIDMAN; SMITH; STRUHL. Current protocols in molecular biology. **Molecular Reproduction and Development**, John Wiley & Sons, Inc., v. 1, n. 2, p. 146–146, 1989. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.1080010210>.

BENTIVOGLIO; FINCO; BACCHI. Interdependencies between Biofuel, Fuel and Food Prices: The Case of the Brazilian Ethanol Market. **Energies**, v. 9, p. 464, 2016.

BUŠIĆ; MARĐETKO; KUNDAS; MORZAK; BELSKAYA; ŠANTEK; KOMES; NOVAK; ŠANTEK. Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. **Food Technol Biotechnology**, v. 56, p. 289–311, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6233010/>. Acesso em: 4 dez. 2021.

CADETE; HERAS; SANDSTRÖM; FERREIRA; GÍRIO; GORWA-GRAUSLUND; ROSA; FONSECA. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 167, 2016.

DOS SANTOS. **Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* como plataformas de análise de enzimas e transportadores envolvidos na metabolização de xilose**. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/180917>. Acesso em: 21 ago. 2021.

DOS SANTOS. **Engenharia genômica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* visando prevenir a endocitose de transportadores de açúcares**. 2019. Qualificação de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina.

DOS SANTOS. **Engenharia genômica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* visando prevenir a endocitose de transportadores de açúcares e aumentar a**

produção de etanol. 2021. PhD. Título TCC – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://url.com>. Acesso em: 4 dez. 2021.

DOS SANTOS. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. Doutor em Ciências – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://tpqb.eq.ufrj.br/download/etanol-de-2a-geracao-por-zymomonas-mobilis.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2021.

DOS SANTOS *et al.* Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 40–57, 2016.

DUNN; HICKE. Domains of the Rsp5 Ubiquitin-Protein Ligase Required for Receptor-mediated and Fluid-Phase Endocytosis. **Molecular biology of the cell**, v. 12, p. 421–35, 2001.

ELBING; LARSSON; BILL; ALBERS; SNOEP; BOLES; HOHMANN; GUSTAFSSON. Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, p. 5323–30, 2004.

FINLEY; ULRICH; SOMMER; KAISER. The Ubiquitin-Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 192, p. 319–60, 2012.

GIETZ; WOODS. Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 313, p. 107–20, 2006.

GOLDEMBERG. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol Biofuels* 1:6. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, p. 6, 2008.

GONÇALVES. **Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***. 2014. Doutor em Bioquímica – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/132426/327368.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2021.

HENDERSON. The 12-transmembrane helix transporters. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 708–721, 1993. ISSN 0955-0674. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095506749390144F>. Acesso em: 6 dez. 2021.

HICKE. Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. **The FASEB Journal**, v. 11, p. 1215–1226, 1997.

HIRSCH. **Metabolização de glicose e xilose por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante após deleção do gene ROD1**. 2017. Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/182252/TCC%20GRADUA%C3%87%C3%830%20de%20EIKE%20HIRSCH.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2021.

HORÁK. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1614, n. 2, p. 139–155, 2003. ISSN 0005-2736. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273603001950>.

HORÁK. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1331, p. 41–79, 1997.

HOVSEPIAN; DEFENOUILLE; ALBANESE; VÁCHOVÁ; GARCIA; PALKOVA; LEON. Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 216, 2017.

JACOBUS; GROSS; CECCATO-ANTONINI, Evansand; GOMBERT. Saccharomyces cerevisiae strains used industrially for bioethanol production. **Essays in Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 147–161, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/EBC20200160>. Acesso em: 19 fev. 2022.

KABACK; SMIRNOVA; KASHO; NIE; ZHOU. The alternating access transport mechanism in LacY. **The Journal of Membrane Biology**, v. 239, p. 85–93, 2011.

KNYCHALA. **Transporte e fermentação de xilose, celobiose e xilobiose por leveduras Saccharomyces cerevisiae recombinantes**. 2017. Doutor em Biotecnologia e Biociências – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/189718/PBTC0270-T.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2021.

KNYCHALA; SANTOS, dos; KRETZER; GELSLEICHTER; LEANDRO; FONSECA; STAMBUK. New strategies for efficient expression of heterologous sugar transporters in Saccharomyces cerevisiae. **J. Fungi**, 2021.

KRAMPE; STAMM; HOLLENBERG; BOLES. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of Saccharomyces cerevisiae occurs in the vacuole after internalization by endocytosis 1. **FEBS Letters**, v. 441, 1998.

KRETZER. **Clonagem, expressão e análise de transportadores de açúcares em linhagens recombinantes de Saccharomyces cerevisiae**. 2017. Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/175232/TCC%5C%20Leonardo%5C%20Gomes%5C%20Kretzer.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2021.

KRUCKEBERG, Arthur; YE; BERDEN; DAM. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **The Biochemical journal**, 339 (Pt 2), p. 299–307, 1999.

KWAK; JIN. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective. **Microbial Cell Factories**, v. 16, 2017.

LAGUNAS. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 10, p. 229–42, 1993.

LAW; MALONEY; WANG. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 289, 2009.

LÉON; HAGUENAUER-TSAPIS. Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. **Experimental cell research**, v. 315, p. 1574–1583, 2009.

LLOPIS-TORREGROSA; FERRI-BLAZQUEZ; ADAM-ARTIGUES; DEFFONTAINES; HEUSDEN, Van; YENUSH. Regulation of the Yeast Hxt6 Hexose Transporter by the Rod1 α -Arrestin, the Snf1 Protein Kinase and the Bmh2 14-3-3 Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, jbc.m116.733923, 2016.

LOPES; PAULILLO, De Lima; GODOY; CHERUBIN; LORENZI; CARVALHO; BERNARDINO; NETO; AMORIM. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, 2016.

MADEJ; DANG; YAN; KABACK. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, 2013.

MAGA; THONEMANN; HIEBEL; SEBASTIÃO; LOPES; FONSECA; GÍRIO. Comparative life cycle assessment of first- and second-generation ethanol from sugarcane in Brazil. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 24, 2019.

MARQUES; RAGHAVENDRAN; STAMBUK; GOMBERT. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, 2015.
Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov107>. Acesso em: 19 fev. 2022.

MATSUSHIKA; INOUE; KODAKI; SAWAYAMA. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: Current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, p. 37–53, 2009.

MOSIER; WYMAN; DALE; ELANDER; LEE; HOLTZAPPLE; LADISCH. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MOURO. **Clonagem e expressão em *Saccharomyces cerevisiae* de xilose redutases e xilitol desidrogenase das leveduras brasileiras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum***. 2016. Doutor em Bioquímica – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/169889/342428.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2021.

NIKKO; SULLIVAN; PELHAM. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. **EMBO reports**, v. 9, p. 1216–21, 2008.

O'DONNELL; MCCARTNEY; CHANDRASHEKARAPPA; ZHANG; THORNER; SCHMIDT. 2-Deoxyglucose Impairs *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Stimulating Snf1-Regulated and α -Arrestin-Mediated Trafficking of Hexose Transporters 1 and 3. **Molecular and cellular biology**, v. 35, 2015.

OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34–50, 2000.

OZCAN; JOHNSTON. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. **Molecular and cellular biology**, v. 15, p. 1564–1572, 1995.

PAIVA; VIEIRA; NONDIER; HAGUENAUER-TSAPIS; CASAL; URBAN-GRIMAL. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast JEN1 transporter: Role of K63-linked ubiquitin chains. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 19228–36, 2009.

PAO; PAULSEN; JR, Saier. Major facilitator superfamily. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, p. 1–34, 1998.

PATIÑO; ORTIZ; VELÁSQUEZ; STAMBUK. d -Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* : A review. **Yeast**, v. 36, 2019.

PITKANEN; ARISTIDOU; SALUSJÄRVI; RUOHONEN; PENTTILÄ. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic engineering**, v. 5, p. 16–31, 2003.

POLO. Signaling-mediated control of ubiquitin ligases in endocytosis. **BMC biology**, v. 10, p. 25, 2012.

PROSSER; PANNUNZIO; BRODSKY; THORNER; WENDLAND; O'DONNELL. Alpha-arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis. **Journal of cell science**, v. 128, 2015.

ROBAK; BALCEREK. Review of Second-Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, 2018.

RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 5, 2010.

SAIER. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, p. 354–411, 2000.

SALES; SCHEID; GONÇALVES; KNYCHALA; MATSUSHIKA; BON; STAMBUK. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Lett.**, v. 10, p. 1973–1982, 2015.

SARITHA; ARORA; NAIN. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. **Indian journal of microbiology**, v. 52, p. 122–30, 2012.

SLININGER; DIEN; LOMONT; BOTHAST; LADISCH; OKOS. Evaluation of a Kinetic Model for Computer Simulation of Growth and Fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Fed D-Xylose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, 2014.

SORGEN; HU; GUAN; KABACK; GIRVIN. An approach to membrane protein structure without crystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 14037–40, 2002.

STAMBUK. **Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives**. [S.l.: s.n.], 2019. .Chap. 3: The leading figures on Bioethanol production, p. 57–91. ISBN 978-1-53615-719-2.

STAMBUK; ELEUTHERIO; FLOREZ-PARDO; SOUTO-MAIOR; BON. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, p. 918–926, 2008.

YARRIS. **The Evolutionary Road to Biofuels**. [S.l.: s.n.], 2010. Disponível em: <https://www2.lbl.gov/Publications/YOS/Feb/>. Acesso em: 7 dez. 2021.

ZHANG; DONALDSON; MA. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology advances**, v. 30, p. 913–919, 2012.