

ALEX GAZOLLA DE CASTRO

**RESPOSTA AO ESTRESSE POR ETANOL EM  
*Saccharomyces cerevisiae* E *Spathaspora passalidarum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C355r  
2019  
Castro, Alex Gazolla de, 1990-  
Resposta ao estresse por etanol em *Saccharomyces cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum* / Alex Gazolla de Castro. – Viçosa, MG, 2019.  
xiii, 160f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. *Spathaspora passalidarum*.  
3. Álcool. 4. Leveduras. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.


CDD 22 ed. 579.562

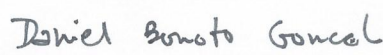
ALEX GAZOLLA DE CASTRO

**RESPOSTA AO ESTRESSE POR ETANOL EM  
*Saccharomyces cerevisiae* E *Spathaspora passalidarum***

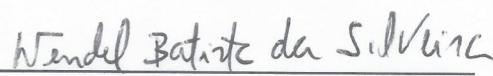
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 26 de abril de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Andréa de Oliveira Barros Ribon

  
\_\_\_\_\_  
Daniel Bonoto Gonçalves

  
\_\_\_\_\_  
Éverton de Almeida Alves Barbosa

  
\_\_\_\_\_  
Wendel Batista da Silveira

  
\_\_\_\_\_  
Tiago Antônio de Oliveira Mendes  
(Presidente da banca)

*Dedico aos meus familiares e amigos. Que me trouxeram até aqui e me sustentaram. Aos que se foram e aos que ficaram.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me dar força e amparo em todos os momentos que precisei de proteção.

À minha família, em especial aos meus pais (Braz e Leci) e aos meus irmãos (Braz, Gustavo e Marcelo), que me deram todo apoio e orientação ao longo da minha trajetória. Graças a todo suporte recebido que pude trilhar meu caminho com confiança.

À minha esposa Lizandra, que faz meus dias mais felizes e tranquilos. Ter a expectativa de que a vida vai ser sempre melhor dá razão a nossa existência e força para seguir a jornada.

À Universidade Federal de Viçosa, e todo seu corpo docente e técnico-administrativo, que me acolheu há 10 anos quando iniciava meus estudos, em especial aos membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Às agências de fomento que contribuem diretamente para o avanço científico. À CAPES, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa, ao CNPq e à Fapemig pelo financiamento de projetos.

Ao professor Luciano Gomes Fietto, por toda orientação e companheirismo ao longo desses anos. Sua empatia é o que nos move a continuar no caminho correto.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes pela coorientação, suporte técnico e teórico, e por nos instigar a ir cada vez mais longe.

Aos membros da banca, efetivos (Andrea, Daniel, Éverton, Wendel) e suplentes (Ananda e Carlos), por me dedicarem seu tempo e contribuírem com seus conhecimentos.

À Géssica e à Fernanda, por dividirem seus projetos, tempo e aprendizados comigo. Obrigado pela amizade e apoio nesse período de muita luta, tornando o processo mais simples.

Aos amigos de laboratório e departamento, em especial Amanda, Ananda, Eduardo, Gilza, Higor, Lílian, Patrícia, Renato, Thays e Valquíria, que fizeram os dias mais divertidos e os experimentos mais fáceis. Obrigado pelas partidas de Quize, piadas ruins, discussões filosóficas e a respeito do trabalho, que tanto contribuíram para o meu aprendizado.

Aos amigos que carrego comigo e que tanto contribuíram para que eu fosse uma pessoa melhor em todos os aspectos.

A todos aqueles que contribuíram, ao seu modo, para que eu chegasse até aqui.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>10</b>
<b>MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE POR ETANOL EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
O remodelamento e a composição da membrana celular contribuem para a aquisição da tolerância ao etanol .....	14
O fluxo de íons é essencial para manutenção do gradiente eletroquímico intermembrana e para o transporte de metabólitos.....	16
A atividade de chaperonas e vias de resposta a proteínas mal- dobradas é essencial para contornar os danos causados pelo etanol ...	20
O acúmulo de metabólitos e a manutenção da estrutura mitocondrial são essenciais para garantia da viabilidade celular na presença do etanol.....	24
A estrutura de fatores de transcrição e a expressão diferencial de genes são importantes para resposta ao estresse .....	30
<b>PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>51</b>
<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DA DELEÇÃO DO GENE <i>APJ1</i> EM LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>52</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>53</b>
Apj1p é uma chaperona putativa da família Hsp40 .....	53

Apj1p está envolvida na degradação de proteínas sumoiladas e em processos fermentativos.....	55
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
Objetivos gerais.....	58
Objetivos específicos.....	58
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>59</b>
Meios de cultura, leveduras e condições de cultivo.....	59
Expressão de <i>APJ1</i> em diferentes concentrações de etanol .....	60
Avaliação da tolerância a etanol.....	62
Efeito da temperatura, pH, concentração de glicose e de ácido acético sobre o crescimento de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .....	64
Quantificação de metabólitos por HPLC e estimativa de parâmetros fermentativos.....	64
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
Confirmação das linhagens em estudo .....	66
Expressão de <i>APJ1</i> em <i>S. cerevisiae</i> BY4741 submetida a estresse por etanol.....	66
Ensaio de tolerância ao etanol não evidenciam diferenças fisiológicas causadas pela deleção de <i>APJ1</i> .....	68
Avaliação do efeito da temperatura, pH, concentração de glicose e ácido acético na fisiologia celular .....	71
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>85</b>
<b>DIFERENÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DE LEVEDURAS: UM FATOR-CHAVE PARA COMPREENSÃO DA BAIXA TOLERÂNCIA AO ETANOL EM <i>Spathaspora passalidarum</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>86</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>90</b>

Produção de etanol e tolerância .....	90
Obtenção das sequências e OrthoMCL analysis.....	91
Análise filogenética e identificação de ortólogos putativos.....	91
Identificação de domínios e características estruturais .....	92
Localização dos genes nos cromossomos e análise de sintenia.....	93
Reconstrução das vias de sinalização e identificação dos genes de resposta.....	93
Extração de RNA e análise de quantitative real-time PCR (qPCR) .....	94
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>96</b>
<i>S. passalidarum</i> possui baixa tolerância ao etanol quando comparada com <i>S. cerevisiae</i> .....	96
Análise de proteínas de <i>S. passalidarum</i> ortólogas de <i>S. cerevisiae</i> evidencia grande diversidade nas sequências dos fatores de transcrição .....	97
Os fatores de transcrição ortólogos de <i>S. passalidarum</i> e <i>S. cerevisiae</i> não apresentam sintenia .....	99
<i>S. passalidarum</i> possui vias de sinalização de estresses conservadas.....	102
Genes responsivos ao estresse por etanol em <i>S. cerevisiae</i> não são induzidos em <i>S. passalidarum</i> .....	104
A divergência dos fatores de transcrição é alta entre diferentes espécies de leveduras .....	104
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>108</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>114</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>157</b>
<b>APÊNDICE A – BANCO DE DADOS DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DE <i>S. passalidarum</i> .....</b>	<b>158</b>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Visão geral do processo de produção de bioetanol (1G e 2G) ..... 3

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Diferentes estruturas e processos celulares afetados pela presença de etanol em meio celular ..... 13

**Figura 2.** Mecanismos utilizados para tolerância a etanol em leveduras .... 38

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Atividade de chaperonas das famílias Hsp40 e Hsp70 no redobramento e desagregação proteica. .... 54

**Figura 2.** Processo de sumoilação de proteínas ..... 56

**Figura 3.** Ensaio fisiológico para avaliação da tolerância ao etanol de linhagens de *S. cerevisiae*. .... 63

**Figura 4.** Gel de agarose (2,0% m/v) para visualização da amplificação de *APJ1* nas linhagens de *S. cerevisiae* BY4741 e Y02999. .... 66

**Figura 5.** Avaliação da qualidade da extração de RNA pelo método descrito ..... 67

**Figura 6.** Análise da expressão do gene *APJ1* por qPCR em *S. cerevisiae* BY4741 ..... 67

**Figura 7.** Avaliação da tolerância ao etanol em linhagens de *S. cerevisiae* com a deleção (Y02999) ou não (BY4741) do gene *APJ1* ..... 69

**Figura 8.** Gráficos de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol em ensaios de fermentação em meio YPD contendo etanol. .... 70

**Figura 9.** Avaliação dos efeitos da presença de ácido acético no meio sobre a capacidade fermentativa das linhagens de *S. cerevisiae* BY4741 e Y02999. .... 72

**Figura 10.** Avaliação dos efeitos de pH e temperatura no crescimento absoluto das linhagens BY4741 e Y02999 ..... 73

**Figura 11.** Gráficos de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol em ensaios de fermentação ..... 75

### **CAPÍTULO 3**

<b>Figura 1.</b> Avaliação da produção e tolerância ao etanol em <i>S. passalidarum</i> .....	97
<b>Figura 2.</b> Análise da ontologia gênica das proteínas únicas identificadas em <i>S. cerevisiae</i> . .....	98
<b>Figura 3.</b> Análise filogenética e estrutural dos fatores de transcrição de <i>S. cerevisiae</i> (Scer) e <i>S. passalidarum</i> (Spas) da família proteica contendo domínios C2H2 Zn-finger .....	100
<b>Figura 4.</b> Inventário dos fatores de transcrição de <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. passalidarum</i> .....	101
<b>Figura 5.</b> Análise da conservação de mecanismos de sinalização e resposta em <i>S. passalidarum</i> .....	103
<b>Figura 6.</b> Análise da expressão de genes responsivos ao estresse por etanol em <i>S. passalidarum</i> .....	106
<b>Figura 7.</b> Matrizes de identidade de proteínas responsivas a estresses de 13 organismos diferentes.....	107

### **APÊNDICE A**

<b>Figura 1.</b> Informações básicas registradas do ortólogo de Msn2p e Msn4p em <i>S. passalidarum</i> . .....	158
<b>Figura 2.</b> Ferramenta de buscas do banco de dados.....	159
<b>Figura 3.</b> Página de registro de proteína.....	160

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Genes e metabólitos envolvidos na tolerância ao etanol.....	35
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão gênica.....	60
--	----

<b>Tabela 2.</b> Parâmetros médios calculados para os ensaios de fermentação das linhagens BY4741 e Y02999 na presença de etanol .....	71
--	----

<b>Tabela 3.</b> Viabilidade celular das linhagens em estudo nas concentrações de 4, 8 e 12% (v/v) de etanol nos ensaios de fermentação .....	71
---	----

<b>Tabela 4.</b> Parâmetros médios calculados para os ensaios de fermentação das linhagens BY4741 e Y02999 na presença de diferentes concentrações de açúcar .....	74
--	----

## RESUMO

CASTRO, Alex Gazolla de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2019. **Resposta ao estresse por etanol em *Saccharomyces cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum***. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Micro-organismos, como leveduras, produzem etanol a partir da fermentação de açúcares. O estresse por etanol é um dos principais fatores limitantes para o processo industrial, uma vez que reduz a eficiência fermentativa e a viabilidade celular. Nesta tese, nós avaliamos a tolerância ao etanol nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum*. No primeiro estudo, foi avaliado o efeito da deleção do gene *APJ1* na capacidade de crescimento de *S. cerevisiae* (linhagens BY4741 e Y02999) sob estresse por etanol. Apj1p é uma possível chaperona relacionada a tolerância ao etanol, embora seus mecanismos de ação ainda não sejam muito claros. Não foram observadas diferenças significativas nos ensaios de crescimento, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, na presença de etanol. Além disso, a adaptação fisiológica a outros estresses (ácido acético, altas concentrações de glicose, pH e temperatura) é similar entre as linhagens em estudo. Assim, embora *APJ1* tenha sido up-regulada sob estresse por etanol, esse gene não está intimamente associado à tolerância ao etanol nas linhagens estudadas. No segundo estudo, nós realizamos análises de genômica comparativa entre *S. cerevisiae* e *S. passalidarum*, a fim de compreender suas diferenças quanto a tolerância ao etanol. Análises de proteínas ortólogas revelaram amplas divergências entre elementos envolvidos no controle transcricional. Comparações sistemáticas indicaram que *S. cerevisiae* possui fatores de transcrição exclusivos, bem como cópias adicionais. Além disso, muitos alinhamentos de sequências entre fatores de transcrição ortólogos compartilharam baixa identidade. Em contraste, a reconstrução de vias de sinalização e a análise de proteínas responsivas ao etanol mostraram alta conservação entre mecanismos de tolerância ao etanol de *S. cerevisiae* e *S. passalidarum*. Por fim, a análise de expressão indicou que genes responsivos ao etanol, como *TPS1*, *HSP30* e *MSN-like*, foram down-

regulados em *S. passalidarum* sob estresse. Juntos, esses resultados indicam que a resposta ao estresse não é exclusivamente dependente de proteínas efetoras. Mais que isso, a adaptação efetiva é dependente de uma complexa rede de controle de expressão gênica, que é afetada por fatores de transcrição.

## ABSTRACT

CASTRO, Alex Gazolla de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2019. **Ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum***. Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Microorganisms, such as yeasts, produce ethanol through sugars fermentation. The ethanol stress is a main limiting factor to industrial process, since it reduces fermentative efficiency and cellular viability. Here, we evaluated ethanol tolerance in yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum*. In first study, the effect of *APJ1* deletion was evaluated in *S. cerevisiae* growth (strains BY4741 and Y02999) under ethanol stress. *Apj1p* is a putative chaperone related to ethanol tolerance, although its action mechanisms remains unclear. No significant differences was observed in growth assays, in solid or liquid medium, containing ethanol. Furthermore, physiological adaptation to other stresses (acetic acid, high glucose concentration, pH and temperature) is similar between strains. Thus, though *APJ1* was up-regulated under ethanol stress, it was not directly associated to ethanol tolerance in evaluated strains. In second study, we performed genomics comparative analysis between *S. cerevisiae* and *S. passalidarum*, to understanding its differences of ethanol tolerance. Analyzes of protein orthologous revealed wide divergences between transcriptional control elements. Systematic comparisons indicated that *S. cerevisiae* has exclusive and additional copies of transcription factors. Besides, many sequence alignment between transcription factors orthologous shared low identity. In contrast, signaling pathways reconstruction and ethanol-responsive proteins analysis showed high conservation between ethanol tolerance mechanisms of *S. cerevisiae* and *S. passalidarum*. Finally, gene expression analysis indicated that ethanol-responsive genes, as *TPS1*, *HSP30*, and *MSN*-like, was down-regulated in *S. passalidarum* under stress. Together, these results indicate that stress response is not exclusively dependent of effectors proteins. Moreover, effective adaptation is dependent on a complex network of gene expression control, which is affected by transcription factors.

## INTRODUÇÃO GERAL

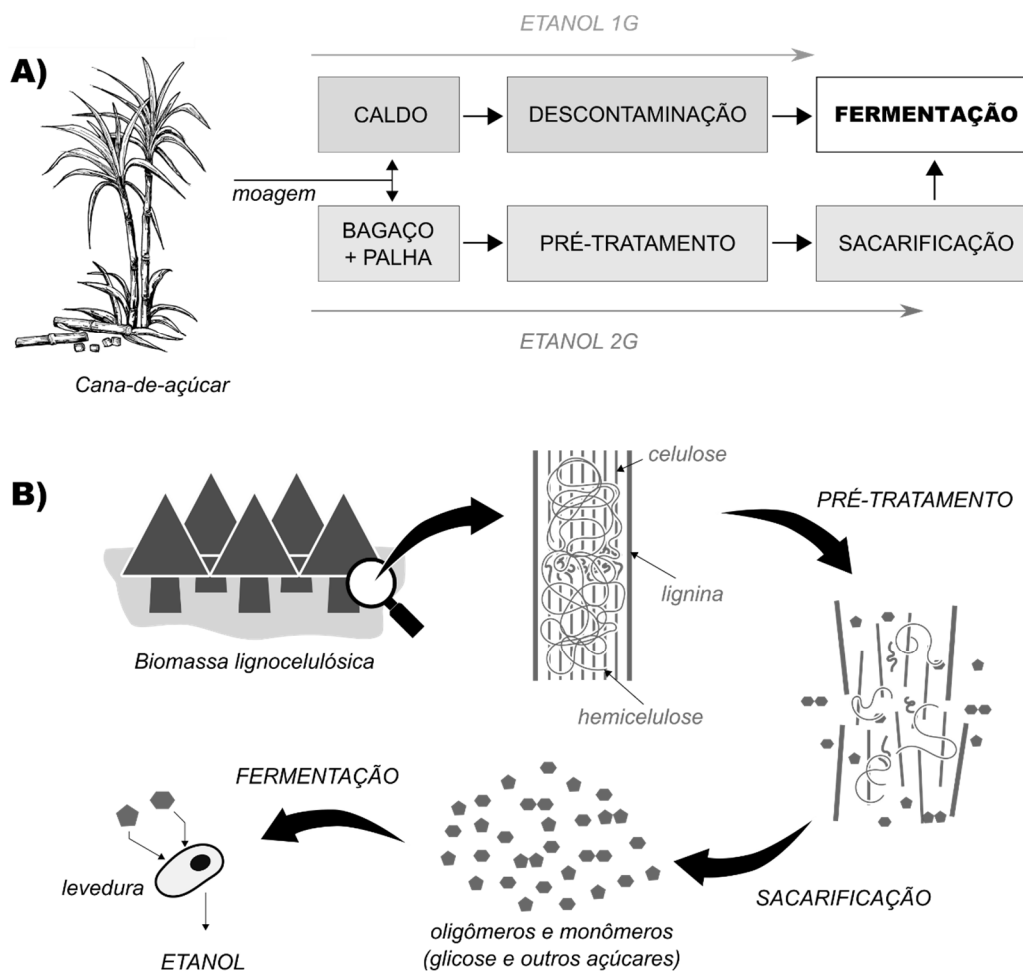
A busca por fontes de energia renováveis para substituição de combustíveis fósseis tem sido um tema amplamente discutido nas últimas décadas, devido a diversos fatores. A redução de emissão de gases do efeito estufa e consequente redução do impacto ambiental, taxa de renovação de reservas de combustíveis fósseis significativamente mais lenta que a taxa de exploração e controle político das maiores reservas de exploração por alguns poucos países são alguns dos principais motivos para o investimento em combustíveis renováveis<sup>1-3</sup>.

Dentre as alternativas aos combustíveis fósseis, o bioetanol – etanol produzido através de biomassa – apresenta-se com grande potencial de utilização em veículos automotores<sup>3</sup>. A utilização de fontes renováveis diversas para produção de combustíveis, associada à redução de emissão de gases do efeito estufa, são as principais vantagens da incorporação do bioetanol à matriz energética<sup>4,5</sup>. Brasil e Estados Unidos são os maiores produtores de bioetanol no mundo, dominando uma parcela superior a 80% de toda a produção global, tendo como base para produção a cana-de-açúcar e o milho, respectivamente. A demanda por etanol como combustível tem crescido anualmente entre diversos países, sendo os Estados Unidos os principais fornecedores, responsável pela produção de mais de 50% de todo etanol combustível no mundo<sup>6-8</sup>.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e a utilização do etanol combustível a partir dessa variedade agrícola data do final do século passado, com o surgimento do Programa Pró-Alcool<sup>6,7</sup>. Atualmente, a maior parte do etanol de primeira geração (1G) é produzido a partir do caldo obtido da cana-de-açúcar, que é submetido a processos de descontaminação e fermentação. Entretanto, uma parcela considerável de toda energia potencial está contida no bagaço e na palha, resíduos agroindustriais da produção de açúcar e etanol combustível<sup>9-11</sup>. Dessa forma, técnicas foram desenvolvidas para o aproveitamento destes resíduos como fonte para produção etanol de segunda geração (2G) e bioeletricidade. A bioeletricidade consiste na queima do bagaço e demais resíduos obtidos

na cultura para a geração de energia em reatores<sup>11</sup>, enquanto a produção de etanol 2G advém do tratamento e fermentação de material lignocelulósico, principalmente bagaço<sup>12</sup>. Estudos apontam que a utilização do bagaço como fonte de produção de etanol poderia aumentar em até 25% o rendimento do processo<sup>10,11</sup>.

A produção de etanol 2G a partir de resíduos lignocelulósicos consiste de três etapas essenciais: pré-tratamento, sacarificação e fermentação (Figura 1). O pré-tratamento é a etapa primordial para obtenção de açúcares fermentescíveis e consiste da utilização de abordagens químicas, físicas e/ou biológicas para romper a estrutura cristalina da lignocelulose a fim de recuperar as porções celulósica (40-50%) e hemicelulósica (25-35%) para posteriores etapas<sup>13,14</sup>. Considerando a complexidade da estrutura lignocelulósica de diferentes cultivares de cana-de-açúcar, a obtenção de um processo eficiente para todas as linhagens agrícolas é um dos principais desafios. A remoção da lignina, a porosidade e área de superfície do bagaço obtido, a cristalinidade da celulose e o grau de polimerização com a hemicelulose afetam a eficiência do pré-tratamento. Além disso, é desejável que haja pouca degradação dos polímeros de açúcares e pouca geração de inibidores e compostos tóxicos como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural<sup>15-17</sup>. A sacarificação é o processo que promove a hidrólise das frações celulósica e hemicelulósica obtidas após o pré-tratamento. Tal processo faz uso de um conjunto amplo de enzimas (celulases e hemicelulases), visto a extensão e complexidade dos polímeros em questão<sup>18,19</sup>. Portanto, a alta demanda e a diversidade de enzimas necessárias tornam esta etapa onerosa<sup>20</sup>. Por fim, a fermentação é a etapa que utiliza microrganismos para conversão dos monômeros de açúcar, obtidos do caldo ou do material lignocelulósico da cana-de-açúcar, em etanol. Os organismos mais comuns na fermentação a etanol são as leveduras e a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada na produção industrial<sup>21</sup>. Entretanto, esta não é uma espécie naturalmente fermentadora de pentoses, despertando o interesse na identificação de organismos capazes de metabolizar tais açúcares com eficiência ou no desenvolvimento de linhagens através de engenharia metabólica<sup>22-24</sup>.



**Figura 1.** Visão geral do processo de produção de bioetanol (1G e 2G). **(A)** Inicialmente, a cana-de-açúcar é transportada até as usinas, onde ela é moída e destinada a duas diferentes linhas de produção de etanol. O caldo obtido segue o destino da produção de *Etanol 1G*, passando por um processo de descontaminação (que faz uso de temperatura para eliminação de eventuais microrganismos), seguido da fermentação realizada por leveduras, que convertem os monômeros e oligômeros de açúcares em etanol. Já o material residual da moagem, segue para produção do *Etanol 2G*, **(B)** no qual o complexo lignocelulósico é submetido a um pré-tratamento (para separação da celulose, hemicelulose e lignina), seguido das etapas de sacarificação (que faz uso de um conjunto amplo de enzimas para promoção da hidrólise dos polímeros celulose e hemicelulose) e fermentação.

É importante notar que a produção do etanol – metabólito de interesse – é um fator limitante na etapa da fermentação. De modo geral, a presença de elevadas concentrações de etanol no meio afeta múltiplas estruturas e processos celulares das leveduras, que podem retardar a capacidade fermentativa e afetar a viabilidade e sobrevivência celular<sup>25,26</sup>. Dessa forma, o presente trabalho apresenta estudos de respostas ao

estresse por etanol nas leveduras *S. cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum*.

No primeiro capítulo, uma avaliação sistemática da literatura fornece informações sobre diferentes mecanismos de tolerância ao etanol em leveduras. Os trabalhos revelam que a resposta fisiológica ao etanol é dependente de uma complexa rede de proteínas responsivas ao estresse<sup>27-30</sup>. Uma vez que o etanol desencadeia eventos de estresse oxidativo e proteínas mal-dobradas, é necessário a ativação de diversos mecanismos para a contenção dos danos celulares causados<sup>31,32</sup>. Entre as alterações celulares observadas, identifica-se fluidização de membrana e despolarização do potencial elétrico, que afeta o transporte de íons e moléculas, comprometendo o efluxo e influxo de componentes celulares essenciais<sup>33,34</sup>. Conseqüentemente, há uma drástica alteração do pH intracelular, que afeta o dobramento proteico. Assim, processos que ocorrem no citosol ou mesmo dentro de organelas são afetados, observando-se maior formação de espécies reativas de oxigênio, danos à estrutura do DNA e de outras macromoléculas, formação de agregados proteicos e alteração morfológica de organelas. Somados, esses danos podem levar a morte celular por mecanismos de apoptose<sup>35-38</sup>. Para contornar esses desafios, leveduras mais tolerantes ao etanol – como linhagens de *S. cerevisiae* – utilizam-se de mecanismos especializados. É comum observar a expressão aumentada de proteínas de membrana H<sup>+</sup>-ATPases, que promovem o efluxo de prótons para manutenção do pH citosólico<sup>39</sup>, ou de chaperonas envolvidas em diversos processos de desagregação e dobramento de proteínas<sup>40-42</sup>. Além disso, a alteração da composição da membrana é essencial para contornar a fluidização promovida pelo etanol<sup>43</sup>, enquanto superóxido dismutases reduzem espécies reativas de oxigênio<sup>44</sup>. Assim, a adaptação fisiológica ao estresse é dependente de uma série de respostas que devem ser precisamente coordenadas.

No segundo capítulo, a fim de avaliar o efeito da deleção do gene *APJ1* em linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* (BY4741), foram conduzidos ensaios fisiológicos em diversas condições de estresse comumente associadas ao processo de produção de etanol. Apj1p é uma possível

chaperona da família Hsp40 envolvida em processos de contenção de propagação de príons<sup>45</sup>. Em 2012, Swinnen e colaboradores identificaram que a deleção de *APJ1* promovia aumento da tolerância ao etanol em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, embora os mecanismos envolvidos na aquisição de tolerância não tenham sido discutidos<sup>46</sup>. Resultados de caracterização fisiológica apontaram para pouco ou nenhum efeito da deleção de *APJ1* sob o crescimento e capacidade produtiva das linhagens em estudo. Estudos adicionais são necessários para confirmar os papéis de Apj1p na aquisição de tolerância ao etanol, avaliando seus efeitos em outras linhagens de *S. cerevisiae* e em leveduras não-Saccharomyces.

No terceiro capítulo, análises de genômica comparativa foram realizadas para rastrear possíveis diferenças entre proteínas de *S. cerevisiae* e *S. passalidarum* capazes de explicar as distintas capacidades de tolerância ao etanol. *Spathaspora passalidarum* é uma levedura eficiente na fermentação de pentoses e hexoses, mesmo em condições de baixa aeração. Entretanto, sua baixa tolerância ao etanol é um fator importante a ser contornado para sua futura utilização em processos industriais<sup>23,47</sup>. As análises de ortólogos revelaram que os fatores de transcrição dessas leveduras são muito distintos, enquanto proteínas envolvidas na sinalização e na resposta efetora ao estresse são amplamente conservadas. Ao avaliar a expressão de genes putativos de *S. passalidarum* envolvidos na fermentação e tolerância ao etanol, como *HSP104*, *TPS1*, *ADH1* e *MSN2/4*, foi possível notar que estes foram down-regulados ou não tiveram expressão alterada, indicando que os mecanismos de controle transcricional falharam na ativação da transcrição de genes envolvidos respostas ao estresse. Assim, é possível notar a importância de mecanismos globais na aquisição de tolerância ao etanol. O controle transcricional é uma estratégia importante, uma vez que promove a alteração da expressão de centenas de alvos de interesse, afetando diretamente processos celulares e vias metabólicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhaskar, T. *et al.* Thermochemical conversion of biomass to biofuels. *Biofuels* 51–77 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-385099-7.00003-6
2. Cherubini, F. & Strømman, A. H. Principles of biorefining. *Biofuels* 3–24 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-385099-7.00001-2
3. Basic, A. *et al.* Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol Biotechnol* 56, 289–311 (2018).
4. Tan, H. T., Corbin, K. R. & Fincher, G. B. Emerging Technologies for the Production of Renewable Liquid Transport Fuels from Biomass Sources Enriched in Plant Cell Walls. *Front Plant Sci* 7, (2016).
5. Somerville, C. The billion-ton biofuels vision. *Science* (80-. ). 312, 1277 (2006).
6. Goldemberg, J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol Biofuels* 1, 6 (2008).
7. de Souza Dias, M. O. *et al.* Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environ. Dev.* 15, 35–51 (2015).
8. Hira, A. Sugar rush: Prospects for a global ethanol market. *Energy Policy* 39, 6925–6935 (2011).
9. Macrelli, S. Ethanol from Sugarcane Lignocellulosic Residues – Opportunities for Process Improvement and Production Cost Reduction. *Department of Chemical Engineering Doctor*, (Lund University, 2014).
10. Macrelli, S., Mogensen, J. & Zacchi, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. *Biotechnol Biofuels* 5, 22 (2012).
11. Furlan, F. F. *et al.* Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible? *Biotechnol Biofuels* 6, 142 (2013).
12. Macrelli, S., Galbe, M. & Wallberg, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. *Biotechnol Biofuels* 7, 26 (2014).
13. Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. & Negro, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol* 101, 4851–4861 (2010).
14. Saritha, M., Arora, A. & Lata. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility.

*Indian J Microbiol* 52, 122–130 (2012).

15. Kumar, R. & Wyman, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog* 25, 302–314 (2009).
16. Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. & Stroeve, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729 (2009).
17. Abo, B. O. *et al.* Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Rev Env. Heal.* (2019). doi:10.1515/reveh-2018-0054
18. Moretti, M. M. S. *et al.* Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis on the physical-chemical composition and morphologic structure of sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Bioresour Technol* 219, 773–777 (2016).
19. Ishola, M. M., Jahandideh, A., Haidarian, B., Brandberg, T. & Taherzadeh, M. J. Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): a novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 133, 68–73 (2013).
20. Kovacs, K., Macrelli, S., Szakacs, G. & Zacchi, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol Biofuels* 2, 14 (2009).
21. Mohd Azhar, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Rep* 10, 52–61 (2017).
22. Moyses, D. N., Reis, V. C., de Almeida, J. R., de Moraes, L. M. & Torres, F. A. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *Int J Mol Sci* 17, 207 (2016).
23. Cadete, R. M. & Rosa, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast* 35, 191–199 (2018).
24. Kricka, W., Fitzpatrick, J. & Bond, U. Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass: a perspective. *Front Microbiol* 5, (2014).
25. Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. & Stanley, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 109, 13–24 (2010).
26. Ma, M. & Liu, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 829–845 (2010).
27. Ramirez-Cordova, J. *et al.* Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in Agave tequilana juice. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 247–255 (2012).

28. Kasavi, C., Eraslan, S., Oner, E. T. & Kirdar, B. An integrative analysis of transcriptomic response of ethanol tolerant strains to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst* 12, 464–476 (2016).
29. Deparis, Q., Claes, A., Foulquie-Moreno, M. R. & Thevelein, J. M. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res* 17, (2017).
30. Kim, S. *et al.* Elucidation of ethanol tolerance mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* by global metabolite profiling. *Biotechnol J* 11, 1221–1229 (2016).
31. Navarro-Tapia, E., Nana, R. K., Querol, A. & Perez-Torrado, R. Ethanol Cellular Defense Induce Unfolded Protein Response in Yeast. *Front Microbiol* 7, 189 (2016).
32. Miyagawa, K., Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K. & Kimata, Y. Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 78, 1389–1391 (2014).
33. Huffer, S., Clark, M. E., Ning, J. C., Blanch, H. W. & Clark, D. S. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl Env. Microbiol* 77, 6400–6408 (2011).
34. Henderson, C. M. & Block, D. E. Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Env. Microbiol* 80, 2966–2972 (2014).
35. Auesukaree, C. *et al.* Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet* 50, 301–310 (2009).
36. Perez-Gallardo, R. V *et al.* Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res* 13, 804–819 (2013).
37. Drakulic, T. *et al.* Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5, 1215–1228 (2005).
38. Farrugia, G. & Balzan, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol* 2, 64 (2012).
39. Fernandes, A. R. & Sa-Correia, I. Transcription patterns of *PMA1* and *PMA2* genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* 20, 207–219 (2003).
40. Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A. & Lindquist, S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* 11, 2357–2364 (1992).

41. Haslbeck, M. *et al.* Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo j* 23, 638–649 (2004).
42. Haslbeck, M. *et al.* Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *Embo j* 18, 6744–6751 (1999).
43. Ishmayana, S., Kennedy, U. J. & Learmonth, R. P. Further investigation of relationships between membrane fluidity and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 33, 218 (2017).
44. Zyrina, A. N., Smirnova, E. A., Markova, O. V, Severin, F. F. & Knorre, D. A. Mitochondrial Superoxide Dismutase and Yap1p Act as a Signaling Module Contributing to Ethanol Tolerance of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Env. Microbiol* 83, (2017).
45. Kryndushkin, D. S., Smirnov, V. N., Ter-Avanesyan, M. D. & Kushnirov, V. V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. *J Biol Chem* 277, 23702–23708 (2002).
46. Swinnen, S. *et al.* Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res* 22, 975–984 (2012).
47. Long, T. M. *et al.* Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Env. Microbiol* 78, 5492–5500 (2012).

## CAPÍTULO I

# MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE POR ETANOL EM *Saccharomyces* *cerevisiae*

## **Mecanismos de aquisição de tolerância ao estresse por etanol em *Saccharomyces cerevisiae***

### **RESUMO**

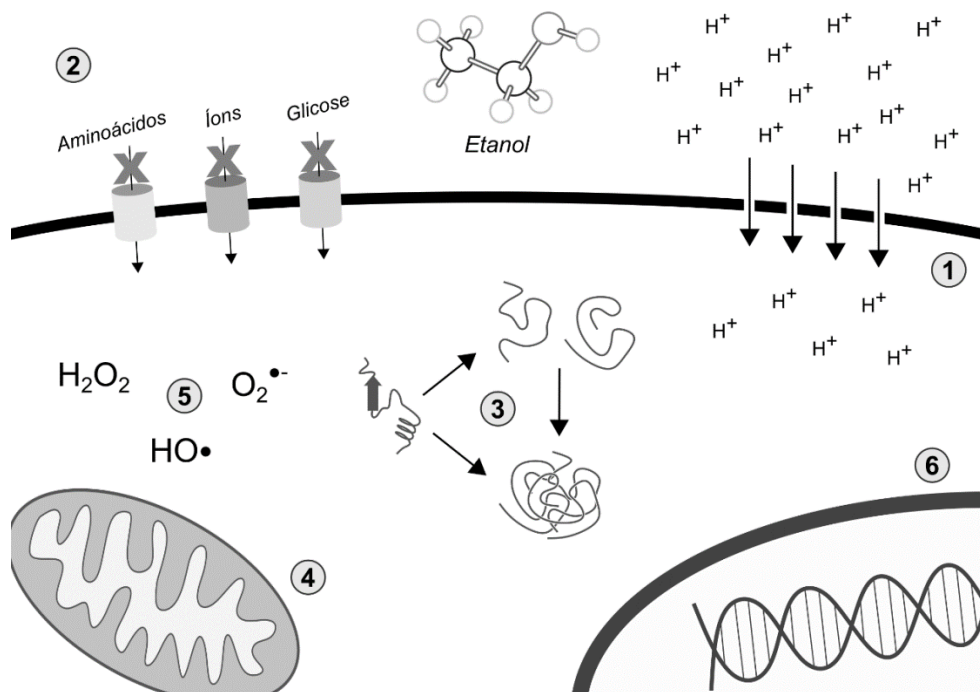
*Saccharomyces cerevisiae* é o organismo mais utilizado na produção de etanol. Entretanto, elevadas concentrações de etanol – como as observadas na fermentação em condições de alto teor de açúcar – comprometem estruturas e processos celulares, afetando a eficiência fermentativa. A compreensão dos mecanismos de tolerância ao etanol é uma tarefa complexa, uma vez que os danos causados por esse metabólito afetam diferentes mecanismos fisiológicos, como fluidez de membrana, manutenção de pH intracelular e do balanço redox, biossíntese de proteínas, estabilidade de polímeros, integridade de DNA genômico, entre outros. Com o advento de tecnologias *highthroughput*, pesquisadores têm identificado novos mecanismos, correlacionando-os às respostas adaptativas ao estresse. A expressão diferencial de genes, a reestruturação de membranas, a ativação de vias de sinalização específicas e a modificação pós-traducional de proteínas constituem mecanismos necessários para contornar os danos causados pelo etanol. Nessa revisão, nós focamos na identificação desses mecanismos para aquisição de tolerância ao etanol por meio do controle e reparo dos danos causados. Essas abordagens contribuem para a compreensão profunda desses processos e seleção de alvos para engenharia genética de leveduras.

**Palavras-chave:** Tolerância ao etanol; Fermentação; Leveduras.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, intensificou-se a busca por combustíveis alternativos ao petróleo, a fim de identificar fontes renováveis de energia e minimizar os impactos ambientais observados pela emissão de gases do efeito estufa<sup>1</sup>. Nesse cenário, o bioetanol se apresenta como uma alternativa promissora e as diferentes estratégias de sua produção têm sido extensivamente estudadas<sup>2</sup>. *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada industrialmente nos processos fermentativos<sup>3,4</sup>. Apesar de sua utilização em dornas de fermentação há décadas, *S. cerevisiae* é sensível a altas concentrações de etanol (superiores a 20% v/v), mesmo por curtos intervalos de tempo<sup>5</sup>. O acúmulo de etanol no meio compromete o crescimento celular e a viabilidade, transporte de metabólitos, fluidez da membrana, integridade do genoma e de proteínas, e fluxo de prótons intermembranas, limitando produtividade e rendimento da fermentação<sup>6-11</sup> (Figura 1).

A resposta ao estresse causado pelo etanol é um fator extremamente importante para a obtenção de um processo consistente e viável. A compreensão da resposta ao estresse e desenvolvimento de tolerância depende de múltiplos fatores e necessita de estudos integrativos, como transcriptoma, proteoma, metaboloma, interactoma e outros<sup>12-14</sup>. Diferentes trabalhos têm demonstrado uma gama diversificada de respostas celulares ao estresse, incluindo regulação transcricional, produção de proteínas de resposta ao estresse (*Heat shock proteins*, Hsp), realocização celular de proteínas, produção de metabólitos específicos, alteração da composição de membrana, ativação de canais de transporte de íons, ativação de vias de redobramento proteico e diversas outras respostas<sup>11,15-18</sup>. Interessantemente, diferentes estresses celulares, como temperatura, etanol ou concentração de sais, desencadeiam eventos celulares diferentes e complexos, mas que culminam em respostas finais similares, como a expressão de genes específicos ou a adaptação do metabolismo mitocondrial, incrementando a produção de ATP através de mudanças proteômicas necessárias para manutenção do balanço energético<sup>19,20</sup>.



**Figura 1.** Diferentes estruturas e processos celulares afetados pela presença de etanol em meio celular. **1)** A principal estrutura afetada pelo etanol é a membrana celular. O etanol intercala entre os ácidos graxos constituintes da membrana e promove sua fluidização, permitindo a passagem de íons e algumas pequenas moléculas, perturbando a homeostase celular. Destaca-se neste contexto o influxo de prótons, que promove acidificação do citosol e dissipa o potencial elétrico intermembrana. **2)** A dissipação do potencial elétrico intermembranas e do gradiente eletroquímico de prótons afeta a capacidade do transporte de íons e moléculas, visto que alguns transportadores são voltagem-dependente ou utilizam a força próton-motora para realizarem cotransporte. Além disso, a própria desestruturação da membrana pode comprometer o funcionamento adequado dos transportadores associados a tal estrutura. **3)** O etanol, somado aos efeitos danosos já observados, afeta o dobramento de proteínas residentes do citosol, bem como o dobramento de proteínas recém-sintetizadas ainda localizadas no retículo endoplasmático. O acúmulo de proteínas mal-dobradas pode levar à formação de agregados proteicos, induzindo a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) e a ativação de vias de apoptose. **4)** O etanol promove a distorção das cristas mitocondriais, além de promover a fluidização de suas membranas, dissipando o gradiente eletroquímico de prótons. Tais fatos acarretam na menor eficiência da produção de ATP, essencial para manutenção da viabilidade celular em situações de estresse, e na maior formação de ROS, possivelmente relacionado a maior ativação da cadeia transportadora de elétrons, afetada pela estrutura danificada das membranas. **5)** As espécies reativas de oxigênio (e.g. peróxido de hidrogênio, superóxidos ou radical hidroxila) afetam diversas estruturas e macromoléculas, como proteínas (3), lipídeos e membranas (1 e 4), além de DNA (6). Em larga escala, tais danos podem culminar na ativação de vias de apoptose.

## **O remodelamento e a composição da membrana celular contribuem para a aquisição da tolerância ao etanol**

A primeira estrutura afetada e que contribui amplamente para a proteção dos organismos frente ao estresse por etanol é a membrana celular das leveduras<sup>21,22</sup>. A crescente presença de etanol no meio de cultura é capaz de alterar a estrutura da membrana, afetando sua integridade, a atividade de proteínas e o fluxo de íons e metabólitos celulares. Tais consequências levam à despolarização e consequente alteração do gradiente eletroquímico intermembranas, comprometendo a eficiência fermentativa<sup>6</sup> e a captação de íons e nutrientes, como  $Mg^{2+}$  e aminoácidos<sup>22</sup>. Para contornar tais deficiências, linhagens de *S. cerevisiae* promovem a expressão de genes envolvidos na estabilização e manutenção da membrana celular e proteínas de membrana, a fim de manter a integridade dessa estrutura<sup>6,23,24</sup>.

Henderson e colaboradores<sup>6</sup> realizaram um amplo estudo de lipidômica, utilizando 22 linhagens de *S. cerevisiae*, a fim de compreender a correlação entre a composição de lipídeos da membrana e a produção de etanol e crescimento celular máximo. As análises foram realizadas com células submetidas à fermentação e coletadas periodicamente, e análises estatísticas apontaram para uma clara correlação entre a composição da membrana e a concentração final de etanol produzido. De forma geral, foi observado que linhagens que apresentavam maior conteúdo de fosfatidilinositol eram incapazes de fermentar todo açúcar utilizado, tornando a fermentação pouco eficiente e incompleta; em contrapartida, as linhagens que apresentavam maiores níveis de fosfatidilcolina apresentaram maiores concentrações de etanol e densidade celular. Entretanto, Furukawa e colaboradores<sup>25</sup> verificaram que a suplementação do meio de cultura com inositol promoveu aumento da viabilidade celular e diminuiu a permeabilidade da membrana ao etanol em *S. cerevisiae*.

Além destes ácidos graxos, outras moléculas interferem diretamente na estrutura da membrana celular, contribuindo para o aumento da tolerância a etanol. Vanegas e equipe<sup>26</sup> identificaram através de estudos

de microscopia (fluorescência e força atômica) em modelos de biomembrana de leveduras, que membranas com maior concentração de ácidos graxos insaturados e ergosterol apresentavam maior resistência à desestruturação em condições de estresse por etanol, enquanto o oposto era observado em membranas com maior composição de ácidos graxos saturados. O mesmo foi observado por Wang e equipe<sup>27</sup> ao comparar o perfil de lipídeos de membrana de três diferentes linhagens de *S. cerevisiae* expostas a concentrações elevadas de etanol, no qual a linhagem mais tolerante apresentava aumento superior a 100% nas concentrações de ergosterol em comparação a linhagem parental, maior conteúdo de ácidos graxos insaturados e maior expressão do gene *OLE1*, responsável por expressar uma enzima (ácido graxo insaturase) essencial para biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico. Dong, Yi e Li<sup>28</sup> avaliaram a composição da membrana de *S. cerevisiae* (S288c) em diferentes estágios celulares, bem como a integridade e diâmetro da célula. Ao decorrer da fermentação, foi observada uma constante redução do diâmetro e integridade de membrana em resposta ao aumento da concentração de etanol. Além disso, células em fase exponencial e estacionária apresentaram maiores concentrações de ácido oleico (18:1) e ergosterol e baixa concentração de ácido hexadecanóico (16:0), em oposição à fase *lag*. Quanto à expressão diferencial, os genes *ACC1* (acetil-CoA carboxilase) e *HFA1* (acetil-CoA carboxilase mitocondrial), responsáveis pela biossíntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia longa, são mais expressos nas fases exponencial e estacionária, em comparação a fase *lag*; *OLE1* tem maior expressão na fase exponencial. Archana e colaboradores<sup>29</sup> e Arroyo-López e colaboradores<sup>30</sup> realizaram um estudo comparando a composição de ácidos graxos de membrana entre leveduras não-*Saccharomyces* e linhagens de *S. cerevisiae*. Interessantemente, as linhagens mais tolerantes apresentaram maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico, quando expostas a etanol, enquanto linhagens não-*Saccharomyces* apresentavam menor concentração destes.

A correlação entre processos de remodelagem da membrana e tolerância ao etanol não são tão previsíveis. O balanço entre ácidos graxos

saturados e insaturados, bem como de esteróis diversos, parece ser crucial para a estruturação de membranas, que sejam capazes de manter a fluidez necessária para o tráfego de lipídeos, proteínas e outras moléculas, mas que mantenham rigidez necessária para impedir o fluxo passivo de etanol e outras moléculas através da membrana. Assim, a fluidez da membrana pode ser majoritariamente controlada por dois mecanismos: i) acúmulo de ácidos graxos monoinsaturados; e ii) acúmulo de esteróis. O acúmulo de ácidos graxos monoinsaturados sugere um aumento da fluidez e permeabilidade da membrana; entretanto, os “espaços” vazios entre as cadeias carbônicas hidrofóbicas desses lipídeos podem funcionar como “arcabouços” para o etanol, reduzindo sua concentração intracelular<sup>31,32</sup>. Curiosamente, a presença de ácidos graxos di-insaturados é maior em linhagens de leveduras menos tolerantes<sup>33</sup>, possivelmente por causar um excesso de fluidez na membrana. Já o aumento da concentração de ergosterol na membrana promove maior rigidez<sup>34</sup>, balanceando o efeito da inserção de ácidos graxos insaturados na estrutura. Apesar disso, diferentes estudos indicam que sua concentração pode não variar e que genes envolvidos em sua biossíntese são down-regulados durante o estresse<sup>30,35,36</sup>. Entretanto, a deleção desses genes afeta o crescimento de *S. cerevisiae* na presença de etanol<sup>8</sup>, o que aponta para sua importância na composição de membranas.

### **O fluxo de íons é essencial para manutenção do gradiente eletroquímico intermembrana e para o transporte de metabólitos**

A fluidização da membrana permite, inicialmente, o fluxo passivo de prótons do meio extracelular para o citosol de leveduras submetidas ao estresse por etanol<sup>37</sup>. Tal fato implica em acidificação do meio intracelular, despolarização intermembrana e consequente desbalanço do fluxo de íons e metabólitos, o que compromete a viabilidade e crescimento celular, bem como a eficiência do processo de fermentação<sup>9,38-40</sup>. Proteínas de membrana são afetadas por esse processo de fluidização e despolarização, tendo suas capacidades de transporte de íons drasticamente afetada<sup>41</sup>. Muito disso

ocorre devido o influxo de prótons para o citosol, que desfaz o gradiente eletroquímico utilizado como força próton-motriz para transporte de diversas moléculas<sup>37,42</sup>.

Uma das formas de controlar esse processo de acidificação e reestabelecer o potencial eletroquímico de membrana é a expressão das H<sup>+</sup>-ATPases de membrana Pma1p e Pma2p, proteínas mais abundantes na membrana de *S. cerevisiae*<sup>42</sup>. Estas são responsáveis por promover a exportação de prótons, de forma dependente de ATP<sup>37</sup>. Fernandes e Sá-Correia<sup>7</sup> observaram maior expressão dos genes de *PMA1* e *PMA2* (3-5 vezes) em células crescendo em etanol, como resposta para minimizar a acidificação do meio. Além disso, é importante observar que a atividade de H<sup>+</sup>-ATPases de membrana de *S. cerevisiae* são dependentes da composição lipídica, principalmente ergosterol e ácido oleico<sup>33</sup>. A maior concentração desses componentes promove maior atividade da bomba de prótons, consequentemente reduzindo a acidificação do citosol e aumentando a tolerância ao etanol. Possivelmente, a membrana de linhagens mais tolerantes ao estresse é mais estável e permite a manutenção do dobramento de proteínas transmembrana (como Pma1p), sendo o acúmulo de ergosterol essencial para garantir esse aumento de rigidez.

A superexpressão de *PMA1* em *S. cerevisiae* aumentou a tolerância a etanol e outros estresses<sup>43</sup>; fisiologicamente, essas células foram capazes de exportar prótons com maior eficiência, apresentaram menor permeabilidade de membrana e menor produção de peróxido de hidrogênio, responsável por causar amplos danos celulares. Curiosamente, a superexpressão de *PMA1* promoveu a ativação de genes regulados por elementos STRE por meio da ativação (fosforilação) de Hog1p, componente chave na via HOG. Resultado similar foi observado previamente para a expressão transiente de *PMA1* em *S. cerevisiae*<sup>44</sup>. Ambos os trabalhos indicam que a ativação de Hog1p é dependente da via de sinalização Sln1p → Ypd1p → Ssk1p → Ssk2p/Ssk22p → Pbs2p, uma cascata de MAPKs que promovem a fosforilação de Hog1p<sup>45</sup>. Sln1p, proteína osmorreguladora transmembrana, inibe a ativação dessa via. Dessa forma, a superexpressão

de *PMA1* pode causar dois efeitos: i) sobrecarga do tráfego vesicular, reduzindo a inserção de Sln1p na membrana; e ii) formação de “ilhas” de Pma1p, que podem afetar a organização de membrana, afetando a estruturação de Sln1p e sua capacidade de autofosforilação. Assim, a superexpressão de *PMA1* contorna o estresse por etanol tanto pela desacidificação do citosol quanto pela ativação de fatores de transcrição controlados por Hog1p, como Msn2p e Msn4p<sup>46</sup>.

A acidificação intracelular relacionada às altas concentrações de etanol interfere diretamente na estrutura vacuolar<sup>47</sup>, dando origem a um único e grande vacúolo que tende a se tornar ácido, graças ao influxo de prótons do citosol para a organela. Auesukaree e equipe<sup>8</sup> fizeram um *screening* de 4828 mutantes de *S. cerevisiae*, a fim de identificar genes potencialmente relacionados a diferentes tipos de estresse. Ao final do estudo, eles identificaram que dezesseis genes relacionados a funções vacuolares são essenciais para tolerância a etanol; destes, a metade compreendia genes codificadores de H<sup>+</sup>-ATPases de vacúolo (V-ATPases) ou estavam envolvidos na função de bombeamento de prótons, indicando a importância da desacidificação do citosol para sobrevivência celular. Na presença de etanol, a expressão de *PMA2* (H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar) é aumentada e o vacúolo torna-se uma importante organela para manutenção do pH citosólico. Esses trabalhos evidenciam o essencial papel das H<sup>+</sup>-ATPases, uma vez que o gradiente eletroquímico da membrana de leveduras é desfeito na ausência de mecanismos de efluxo de prótons, desestruturando todo o sistema de transporte celular. Mais que isso, a crescente acidificação do citosol afetaria o dobramento proteico e o equilíbrio químico de diversas reações intracelulares, comprometendo a homeostase celular.

Além do controle do tráfego de prótons intermembranas, diversos estudos mostram a importância do fluxo celular de outros íons. O transporte de Ca<sup>2+</sup> foi identificado como mecanismo de suporte a tolerância a diferentes estímulos intra- e extracelulares, como estresse alcalino<sup>48,49</sup> e mau-dobramento proteico no retículo endoplasmático<sup>38,50</sup>. Courchesne e colaboradores<sup>51</sup> hipotetizaram que o influxo de Ca<sup>2+</sup> para o citosol deveria

contribuir para o processo de tolerância a etanol em *S. cerevisiae*, de forma similar ao observado em outros tipos de estresse. Os resultados apontam para o influxo de cálcio aumentado em maiores concentrações de etanol, sendo o efeito potencializado quando na presença de osmoprotetores, como prolina. Além disso, a presença de um canal voltagem-dependente (Cch1p) é essencial para o transporte em condição de estresse, uma vez que sua deleção promoveu uma redução de mais de 90% na mobilização de cálcio, comparado à linhagem parental. A perturbação da estrutura da membrana é o fator que ativa o canal Cch1p, levando ao influxo de cálcio que promove a ativação de vias de sinalização intracelular, como fusão de vacúolos, organização de citoesqueleto, eventos de mitose e outros<sup>52</sup>. A presença de cálcio no retículo endoplasmático garante a retenção de proteínas bem como o dobramento e processamento adequado de proteínas em síntese<sup>53</sup>, enquanto a depleção deste cátion promove a ativação da via de resposta a proteínas não dobradas (UPR, *unfolded protein response*)<sup>54</sup>, que determina o sucesso ou não da sobrevivência celular. Além disso, a depleção de cálcio promove aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), retarda o crescimento celular e afeta a capacidade fermentativa<sup>38</sup>. O cálcio é um segundo mensageiro essencial na resposta a diversos estímulos ambientais, incluindo o etanol<sup>55</sup>, e por isso o controle preciso de seu fluxo celular é determinante para a viabilidade de leveduras.

Outro íon essencial a homeostase celular de leveduras é o magnésio ( $Mg^{2+}$ ), cofator para diversas enzimas e biomoléculas, envolvido em diferentes vias metabólicas e na manutenção da estabilidade de biopolímeros, como cromossomos e membrana<sup>56,57</sup>. O estudo conduzido por Barros de Souza e equipe<sup>39</sup> buscou compreender o efeito bioquímico em *S. cerevisiae* da suplementação de meio de fermentação com magnésio. Inicialmente, foi observado aumento no rendimento e tolerância ao etanol. Esse efeito é possivelmente explicado pela expressão de um conjunto de genes (*Environmental Stress Response*, ESR) que são comumente reprimidos na presença de glicose (*Glucose Catabolite Repression*, GCR). Possivelmente, a presença intracelular de magnésio é essencial para manutenção da integridade da membrana celular e da estruturação de

complexos proteicos, capazes de ativar vias de sinalização que respondem ao estresse por etanol. A deficiência desse íon pode reduzir a tolerância de *S. cerevisiae*, afetando crescimento celular durante o acúmulo de etanol no meio. A suplementação com  $Mg^{2+}$  é capaz de restaurar o crescimento da levedura, estendendo a fase exponencial de crescimento e aumentando o rendimento da fermentação<sup>58</sup>.

O controle da concentração intracelular de íons e outros componentes inorgânicos proporciona um mecanismo simples e eficiente para aumentar a tolerância a etanol em leveduras. Estudos fisiológicos devem ser conduzidos para avaliar o efeito da suplementação desses íons em meios de fermentação frente a diversos estresses, como os causados pela presença de etanol e inibidores da fermentação ou por temperaturas elevadas. Uma vez que o etanol permeabiliza a membrana e afeta o transporte iônico, tentar compensar esse efeito por meio da alteração do microambiente celular é uma alternativa. Lam e colaboradores mostraram que a simples suplementação do meio de cultura com  $K^+$  é capaz de aumentar a tolerância ao etanol, possivelmente por mecanismos físico-químicos de manutenção do gradiente eletroquímico intermembrana, que impedem o efluxo passivo de potássio<sup>59</sup>. Ao considerar que na presença de etanol, prótons são passivamente transportados para o citosol, alterar o pH do meio externo para um valor mais básico pode reduzir esse influxo de  $H^+$  ao afetar o equilíbrio químico.

### **A atividade de chaperonas e vias de resposta a proteínas mal-dobradas é essencial para contornar os danos causados pelo etanol**

A biossíntese adequada de proteínas é essencial para manutenção da viabilidade celular. O retículo endoplasmático desempenha papel fundamental na síntese e dobramento de proteínas em leveduras, incluindo aquelas que serão secretadas e/ou localizadas na membrana, como bombas de prótons<sup>60</sup>. A crescente concentração de etanol promove o mau-dobramento de diversas proteínas citosólicas, além de promover estresse no retículo endoplasmático, impedindo o enovelamento adequado

das proteínas recém-sintetizadas<sup>11,18</sup>. Esse efeito pode ser ocasionado i) pela alteração do pH citosólico, que afeta diretamente a estrutura de resíduos de aminoácidos; ii) pela alteração da estruturação do retículo endoplasmático, devido ao aumento da fluidez da membrana dessa organela; e iii) pela alteração da polaridade do citosol, devido a presença do etanol e outros íons. Conseqüentemente, a via UPR, conservada entre os mais diversos eucariotos, é ativada a fim de reestabelecer a homeostase proteica, restaurando a capacidade de dobramento proteico e secreção do retículo endoplasmático por meio do controle da expressão gênica<sup>61-63</sup>.

Em leveduras, a ativação da via UPR clássica tem início com o reconhecimento do estresse através da proteína reticular transmembrana Ire1p (cinase e ribonuclease); ao se ligar a proteínas com dobramentos errôneos, Ire1p se dimeriza através de mecanismos de *trans*-autofosforilação<sup>64-66</sup>. Quando ativada, Ire1p cliva o pré-mRNA de *HAC1* (fator de transcrição), cuja forma ativa é translocada para o núcleo e ativa um amplo conjunto de genes (*UPR genes*), incluindo chaperonas, enzimas de biossíntese de lipídeos e transporte de vesículas<sup>11,65</sup>. Miyagawa e colegas<sup>61</sup> observaram que elevadas concentrações de etanol (16% v/v) implicavam em ativação constante de Ire1p seguido de altos níveis sustentados de *HAC1* processado, levando a ativação da via UPR. Embora a via tente reestabelecer a homeostase celular<sup>61</sup>, a sua ativação constante pode acarretar em apoptose<sup>67</sup>. Como observado por Chawla e colaboradores<sup>65</sup>, a atenuação da via UPR é essencial para a sobrevivência e crescimento celular.

Curiosamente, não só a via UPR-clássica é ativada durante o estresse por etanol<sup>11</sup>, mas uma resposta independente da ligação de Ire1p a proteínas mal-dobradas também é observada. Navarro-Tapia e colegas<sup>18</sup> inspecionaram a ativação da via UPR em concentrações de etanol de 8% (v/v) e verificaram que não havia mau-dobrimento proteico intracelular. Além disso, observaram uma redução das dimensões de retículo endoplasmático, contrário ao observado a condições de estresse que ativam a via UPR clássica<sup>68</sup>. Os resultados apontam para ativação da via UPR devido à reestruturação da membrana (depleção de inositol) do retículo

endoplasmático e de outras organelas, de forma similar ao observado em estudos anteriores<sup>69,70</sup>. Assim, se não havia acúmulo de proteínas com dobramento errôneo, possivelmente a via UPR estava sendo ativada pela depleção de inositol na membrana do retículo<sup>69</sup>. Entretanto, a concentração de inositol na membrana e a expressão dos genes de biossíntese de fosfatidilinositol não foram afetadas<sup>18</sup>. Dessa forma, o etanol ativa a via UPR por mecanismos ainda desconhecidos. Possivelmente, alterações promovidas na estrutura da membrana do retículo e/ou no potencial eletrostático intermembranas pode levar à oligomerização de Ire1p e desencadear os eventos da sinalização<sup>61</sup>.

Uma forma de contornar o mau-dobrimento proteico promovido pelo etanol envolve a utilização de chaperonas moleculares, que previnem a formação de agregados proteicos bem como assistem o dobramento de diversas outras proteínas, contribuindo para a homeostase e viabilidade celular frente a diferentes tipos de estresse<sup>71</sup>. Um conjunto destas chaperonas é expresso em condições no qual há demanda por rápida adaptação celular ao estresse, sendo inicialmente identificadas como elementos de resposta ao estresse por temperatura, dando origem ao termo *Heat Shock Proteins* (HSPs)<sup>72</sup>. Diversos estudos mostram que as HSPs têm papel essencial na sobrevivência celular de leveduras quando expostas a altas concentrações de etanol e que essa é uma das principais ferramentas celulares na aquisição de tolerância ao etanol. A expressão de HSPs é uma resposta comum em diferentes linhagens de levedura, como observado nos trabalhos de Alexandre *et al.*<sup>73</sup>, Piper *et al.*<sup>74,75</sup>, Lv *et al.*<sup>76</sup> e Sakurai e Ota<sup>77</sup>.

Navarro-Tapia e colaboradores<sup>11</sup> avaliaram a expressão global de genes em duas linhagens de *S. cerevisiae*, crescidas em 10% de etanol (v/v). Nos estágios iniciais de crescimento, ambas as linhagens apresentaram maior expressão (em comparação a ausência de etanol) de diferentes genes de HSPs, como *HSP12*, *HSP26* e *HSP42*. A superexpressão de *HSP12* está correlacionada à proteção da membrana celular, impedindo a dessecação da levedura<sup>78</sup>, de forma similar a trealose<sup>79</sup>. Sakurai e Ota<sup>77</sup>, a fim de avaliar a influência de diferentes chaperonas em aspectos celulares, como crescimento e tolerância a estresses,

desenvolveram linhagens mutantes de *S. cerevisiae* com alterações na região promotora (*heat shock elements*) de dois genes nucleares (isoformas de Hsp90), bem como de cinco genes mitocondriais (*HSP10*, *HSP60*, *HSP78*, *MDJ1* e *SSC1*), impedindo a ligação do fator de transcrição HSF (*heat shock transcription factor*) comumente associado a respostas a diferentes estresses. De forma geral, todas as linhagens mutantes apresentaram crescimento celular mais lento e reduzido, acúmulo de estresse proteico (através de agregados) e perda da viabilidade celular na presença de etanol 8% (v/v).

Piper e colaboradores<sup>75</sup> mostraram que a crescente concentração de etanol implicava na maior expressão do gene *HSP30* em *S. cerevisiae*, que codifica uma chaperona integral da membrana plasmática. Hsp30p é um regulador negativo de Pma1p, reduzindo a atividade dessa bomba de prótons<sup>74,75</sup>. Assim, graças a essa chaperona, o efluxo celular de prótons é reduzido, e apesar desse efeito ser aparentemente contraditório contra o estresse, o controle do consumo de ATP é essencial para garantia da viabilidade de outros processos celulares. É essencial notar que há consumo de energia na biossíntese de macromoléculas, no redobramento e desagregação de proteínas por outras chaperonas, na reestruturação da membrana e mesmo em vias de sinalização.

Outras chaperonas moleculares, como Hsp104p, Hsp26p e Hsp42p são essenciais no processo de ligação a proteínas não-dobradas ou mal-dobradas<sup>80-82</sup>, impedindo formação de agregados e consequente ativação de vias de apoptose<sup>83,84</sup>. Diferentes estudos já observaram a maior expressão de *HSP104*, disagregase essencial para manutenção da homeostase celular<sup>85</sup>, em altas concentrações de etanol<sup>35,86-88</sup>. Sanchez e colaboradores<sup>85</sup> mostraram o papel de Hsp104p para tolerância frente a diversos estresses, como temperatura, etanol e arsenito. Inicialmente, foi verificada a presença de Hsp104p apenas em condições de estresse por etanol, enquanto na ausência deste não havia expressão proteica. Além disso, a presença de Hsp104p permitia uma ligeira sobrevivência celular frente a elevadas concentrações de etanol (20% v/v), enquanto linhagens deletadas não suportavam tais concentrações.

## O acúmulo de metabólitos e a manutenção da estrutura mitocondrial são essenciais para garantia da viabilidade celular na presença do etanol

A mitocôndria, estrutura essencial para manutenção da viabilidade celular<sup>89</sup>, é amplamente afetada em condições de estresse por etanol, no qual é observada a distorção da estrutura da membrana e cristas mitocondriais<sup>47</sup>. Essa distorção ocorre devido à perda de seletividade da membrana, permitindo o fluxo de diferentes moléculas; por consequência, o sistema de transporte de elétrons é amplamente afetado, implicando em redução da produção de ATP e aumento na formação de ROS<sup>90-92</sup>. A presença de ROS promove danos a diversas macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídeos<sup>93,94</sup> que, em larga escala, culminam em eventos de apoptose<sup>84,95</sup>. Para minimizar os impactos causados por ROS, metabólitos celulares como glutathiona<sup>96</sup> e alguns aminoácidos<sup>97-99</sup> desempenham papel na captura e redução destas moléculas, mantendo a homeostase celular.

Gostimskaya e Grant<sup>96</sup> verificaram o papel da glutathiona na manutenção do potencial redox mitocondrial, cuja forma reduzida é essencial para redução de radicais<sup>95</sup>. Comparando duas linhagens de *S. cerevisiae* (WT e  $\Delta glr1$  mitocondrial, glutathiona redutase), foi possível verificar que a linhagem mutante era incapaz de manter o potencial redutor mitocondrial, apresentando maior grau de oxidação. Quando ambas as linhagens foram submetidas a estresse por peróxido de hidrogênio, a linhagem mutante foi mais sensível e apresentou menor viabilidade celular – de forma similar a linhagens que não apresentavam nenhuma glutathiona redutase. Pérez-Gallardo e colaboradores<sup>92</sup> avaliaram a formação de ROS em linhagens de *S. cerevisiae* submetidas a altas concentrações de etanol e verificaram que todas apresentavam maiores concentrações de ROS mitocondrial e citosólico, menores razões de GSH/GSSG (glutathiona reduzida/glutathiona oxidada) e integridade comprometida do citocromo c – ativador de vias de apoptose<sup>100</sup>. Linhagens mutantes para os genes *ISC*, envolvidos na biogênese de complexos Fe-S comuns entre complexos da cadeia transportadora de elétrons<sup>101</sup>, apresentavam tais danos mais proeminentes, possivelmente relacionados às falhas no sistema de transporte de

elétrons<sup>102</sup>, implicando em menor viabilidade celular e menor acúmulo de etanol ao longo do processo fermentativo.

Além destes mecanismos, a utilização de enzimas compreende uma alternativa ao controle da formação de ROS. Superóxidos dismutases (SODs) são essenciais para processos iniciais de detoxificação celular, promovendo a redução de superóxidos<sup>84,103</sup>. A deleção de *SOD2*, uma superóxido dismutase mitocondrial, implica em drástica redução na tolerância a etanol, diferentemente da deleção de *SOD1* (citossólica), que não apresenta efeito significativo em comparação à linhagem *background*<sup>104</sup>, de forma similar ao observado nos estudos de silenciamento de *GLR1*, cujo silenciamento da glutatona redutase citossólica não implicou em diminuição da tolerância<sup>96</sup>. Interessantemente, as espécies reativas de oxigênio formadas atuam controlando também fatores de transcrição. Zyrina e colaboradores<sup>105</sup> verificaram que o silenciamento de *SOD2* impedia a formação de peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae*; como consequência, o fator de transcrição Yap1 não era translocado para o núcleo, acarretando na redução da expressão dos genes *GSH1* e *TRX2* (tioredoxina citoplasmática) e na redução da tolerância a altas concentrações de etanol. Juntos, esses trabalhos confirmam que a manutenção da estrutura mitocondrial e seu potencial redutor são essenciais para a garantia da viabilidade celular e tolerância ao etanol. Isso ocorre por uma série de motivos: i) a fluidização das membranas mitocondriais acarreta na dissipação do gradiente eletroquímico; ii) com isso, o sistema de transporte de elétrons fica mais propenso a permitir “escapes”, levando os elétrons livres à formação de radicais, como superóxidos; iii) além disso, o extravasamento de citocromo c da mitocôndria é o gatilho para diversos eventos de apoptose; e iv) o genoma mitocondrial tem sua integridade também comprometida, afetando a expressão de moléculas redutoras, como glutatona, e enzimas de detoxificação de superóxidos, como *SOD2*.

O acúmulo de metabólitos no citosol é também um fator importante para manutenção da integridade celular. A produção e acúmulo de trealose constitui uma estratégia interessante para aquisição de tolerância a diversos estresses<sup>106</sup>. Sabe-se que a trealose – chaperona

química – é capaz de estabilizar proteínas e membranas, contribuindo para manutenção da homeostase celular e capacidade de crescimento frente ao estresse<sup>107</sup>. O acúmulo desse carboidrato no citosol de leveduras é correlacionado com fenótipos de maior tolerância ao etanol<sup>108,109</sup>. Wang e colaboradores verificaram que o acúmulo de trealose é muito importante para a fermentação VHG (*very high gravity*, contendo alto teor de açúcar), garantindo a integridade da membrana e a eficácia da resposta antioxidante<sup>108</sup>. A partir disso, estudos superexpressando genes da biossíntese de trealose surgiram como alternativa para aumento da tolerância ao etanol de linhagens de leveduras. A superexpressão de *TPS1* promoveu aumento da biossíntese e acúmulo de trealose em *S. cerevisiae*, resultando em maior eficiência fermentativa e tolerância ao etanol<sup>110,111</sup>. Moon e colaboradores<sup>112</sup> verificaram que a expressão do gene trealose-6-fosfato sintase da bactéria *Streptomyces albus* promoveu maior acúmulo de trealose e consequente aumento da tolerância a etanol e capacidade fermentativa, indicando que mesmo a expressão heteróloga de genes envolvidos na produção de trealose geram efeito positivo sobre a resposta fisiológica ao estresse.

Não apenas carboidratos estão envolvidos com a tolerância ao etanol, mas o acúmulo de aminoácidos também contribui para a resposta ao estresse. Kasavi e colaboradores<sup>113</sup> desenvolveram uma rede de interações, baseada em bancos de dados de interação proteína-proteína e na ontologia de genes, a fim de identificar proteínas possivelmente envolvidas no processo de tolerância a etanol. Após refinamento da rede e curadoria manual, duas proteínas com funções biológicas desconhecidas (associadas a *clusters* com proteínas envolvidas em respostas a estresse ao etanol) foram identificadas e estudadas (genes *YDR307W* e *YHL042W*). Interessantemente, suas deleções implicaram em aumento de tolerância a etanol e promoveram *up*-regulação de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e na biogênese de ribossomos, normalmente *down*-regulados em condições de estresse<sup>10,97</sup>. Lewis e colaboradores<sup>97</sup> confirmaram, através de ensaios de microarranjo, em um estudo com três diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (S288c, M22 e YPS613), que o

estresse causado por etanol promove repressão significativa (superior a três vezes) de genes envolvidos na biossíntese de proteínas e na biogênese de ribossomos, mostrando a importância do metabolismo de nitrogênio na tolerância a etanol. Tal resultado é consistente a observações feitas por Hirasawa e equipe<sup>114</sup>, que identificaram que o aumento na expressão de genes relacionados à síntese de triptofano garantia maior tolerância a etanol. Além disso, resultados posteriores indicaram que a suplementação do meio de cultura com triptofano em paralelo a superexpressão de permeases específicas promoviam o mesmo efeito de tolerância a estresse, confirmando a importância deste aminoácido para o processo – embora seu papel não esteja claro. Possivelmente, a necessidade de triptofano na biossíntese *de novo* de NAD(P)<sup>115</sup> pode ser a chave pra explicar o aumento da tolerância a etanol, visto que a presença de NADPH é essencial para manutenção do balanço redox celular<sup>116</sup>.

O mesmo efeito protetivo frente ao estresse pode ser observado com outros aminoácidos. O acúmulo de prolina contribui para maior tolerância a etanol, mesmo em altos níveis de estresse por um período prolongado (48 horas, 18% etanol v/v)<sup>98</sup>. Entretanto, o excesso de prolina pode ser tóxico para as leveduras, implicando em morte ou retardo no crescimento celular<sup>10</sup>. Takagi e colaboradores<sup>117</sup> verificaram que o efeito da prolina sobre o aumento da viabilidade celular de *S. cerevisiae*, sob condição de estresse, está correlacionado aos níveis de espécies reativas de oxigênio. Células submetidas a altas concentrações de etanol (5 horas, 14% v/v) apresentam maior formação de ROS<sup>92</sup>, diminuindo a viabilidade celular e a taxa de sobrevivência. Linhagens acumuladoras de prolina apresentaram maior taxa de sobrevivência e menores concentrações de ROS quando expostas às mesmas condições de estresse – tal característica foi observada independente da origem da prolina (endógena ou exógena). Estudos prévios indicaram que a prolina (livre ou envolvida em ligação peptídica) é capaz de reagir com diferentes ROS, formando moléculas estáveis e minimizando os danos causados pelo estresse oxidativo<sup>118,119</sup>. Liang, Dickman e Becker<sup>120</sup> observaram em linhagens de *S. cerevisiae* *knockout* para os genes de biossíntese de prolina (*PRO1*, *PRO2* e *PRO3*),

que a deficiência deste aminoácido aumentava os níveis intracelulares de ROS, aumentava a razão NADP<sup>+</sup>/NADPH e inibia a ativação da via UPR, embora a correlação entre estas respostas e o nível de prolina não tenha sido claramente estabelecida.

O aminoácido arginina desempenha papel similar na tolerância ao estresse por etanol. Estudos recentes em *S. cerevisiae*<sup>99,121</sup> indicaram que o acúmulo de arginina intracelular (através do fornecimento de aminoácido no meio, ou da superexpressão de genes envolvidos na biossíntese) culminava em um aumento na tolerância a etanol, enquanto a diminuição da concentração de arginina tornava a linhagem mais sensível ao estresse. Dois diferentes mecanismos, ainda não muito claros, foram observados para explicar essa resposta: a arginina é capaz de reduzir os danos causados à membrana celular e parede celular pelo etanol, conseqüentemente diminuindo o dano às estruturas de organelas intracelulares<sup>99</sup>; e o acúmulo deste aminoácido diminui os níveis intracelulares de ROS quando há estresse oxidativo causado pelo etanol<sup>99,121</sup>. Há uma clara correlação identificada entre as vias de biossíntese de arginina e prolina, uma vez que a arginina é produzida através da prolina, em uma série de reações que possui uma N-acetiltransferase como enzima intermediária do processo. Nishimura e colaboradores<sup>121</sup> verificaram que tal enzima, codificada pelo gene *MPR1*, está envolvida na biossíntese de arginina e que esta via confere tolerância ao estresse por etanol através de um mecanismo antioxidativo ainda não esclarecido, capaz de promover redução dos níveis de ROS intracelulares.

Ohta e colaboradores<sup>13</sup> utilizaram 14 linhagens de *S. cerevisiae* e através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, fizeram a quantificação de 36 diferentes compostos após a exposição das células a 5% (v/v) de etanol. Tal abordagem permitiu a identificação de diversos compostos que garantiram maior tolerância a etanol (*e.g.*, trealose, valina e prolina, além de intermediários na produção de ATP). Uma vez que valina foi um dos metabólitos identificados mais intimamente relacionados à tolerância a etanol, os pesquisadores promoveram a deleção dos genes *LEU4* e *LEU9* para promover o acúmulo de valina, impedindo sua conversão à leucina, observando aumento na

tolerância a etanol. Estudos anteriores<sup>9</sup> indicaram que a deficiência na captação de leucina em linhagens auxotróficas tornava as células hipersensíveis ao etanol. Li e colegas<sup>122</sup> investigaram o papel de diferentes metabólitos em *S. cerevisiae* sob estresse por etanol (0-15% v/v). Confirmando resultados já observados, houve um aumento característico em ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa. Além disso, alguns aminoácidos (lisina, tirosina, leucina e prolina) apresentaram-se em maior quantidade em elevadas concentrações de etanol, reiterando o papel importante frente ao estresse. Por fim, intermediários da via glicolítica foram identificados em menores quantidades, o que pode ser interpretado como fator limitante para o crescimento celular em elevadas concentrações de etanol, bem como pode correlacionar-se à menor eficiência fermentativa e de captação de glicose sob estresse.

É importante ressaltar que, sob elevadas concentrações de etanol, a levedura possivelmente promove um shutdown do metabolismo fermentativo, tentando conter os danos causados pelo estresse bem como impedir que este se intensifique. Assim, o aumento da tolerância ao etanol em leveduras a partir de metabólitos é uma interessante estratégia para a indústria. A suplementação de meios de fermentação com aminoácidos é uma estratégia simples e pode promover maior eficiência do processo. Em paralelo, os estudos apresentados confirmam o papel dos diferentes íons e metabólitos em outras condições de estresse, como elevadas temperaturas. Assim, o enriquecimento dos meios fermentativos pode causar um amplo efeito fisiológico frente aos diversos desafios ambientais. Mais que isso, determinar a composição ideal do meio de fermentação, suplementado com íons, aminoácidos e vitaminas, pode tornar viável a utilização industrial de leveduras naturalmente menos tolerantes a estresses.

## **A estrutura de fatores de transcrição e a expressão diferencial de genes são importantes para resposta ao estresse**

O controle transcricional é uma forma importante de adaptação rápida e específica a diferentes estímulos ambientais. Diferentes grupos de pesquisa têm identificado o papel essencial da expressão gênica diferencial na tolerância a estresses, incluindo ao etanol. Análises de transcriptoma permitem uma visão mais completa de como diferentes linhagens de levedura toleram altos níveis de etanol, oferecendo aos pesquisadores a possibilidade de abordagens futuras mais específicas.

Dinh e colaboradores<sup>123</sup> utilizaram duas linhagens de *S. cerevisiae* em um estudo utilizando a técnica de microarranjo de DNA. As células, expostas a 10% de etanol (v/v) apresentaram perfis de expressão amplamente diferentes quando comparadas entre si nas condições de estresse e quando comparadas ao controle (ausência de etanol). Observou-se, dessa forma, que genes *up*-regulados em ambas as linhagens eram essenciais para sobrevivência celular e crescimento (*e.g.*, homeostase de prótons, metabolismo de arginina e síntese de ATP na mitocôndria); além disso, genes (36 no total) relacionados a proteínas ribossomais foram especificamente *up*-regulados apenas na linhagem mais tolerante, indicando o importante papel da biossíntese de proteínas para a tolerância ao etanol durante longos períodos de exposição ao estresse. Ma e Liu<sup>35</sup>, a partir de estudos anteriores utilizando a técnica de microarranjo, selecionaram 175 genes envolvidos na tolerância e produção de etanol para quantificação através de qPCR. As quantificações da expressão foram realizadas em diferentes tempos (0, 1, 6, 24 e 48 h) após a adição de etanol ao meio de cultura das duas linhagens em estudo. Diferentes genes de *HSPs* foram mais expressos na linhagem mais tolerante em todos os intervalos de tempo em análise, enquanto na linhagem menos tolerante, a expressão destes foi reprimida após o período de 6 horas. Além disso, genes envolvidos na biossíntese de triptofano, prolina e ácidos graxos de membrana, bem como fatores de transcrição, apresentaram maior expressão na linhagem mais tolerante quando estressada, enquanto tais genes foram reprimidos na outra linhagem.

Li e colaboradores<sup>124</sup> também fizeram uso da técnica de microarranjo para avaliar a expressão diferencial de genes, comparando linhagens haploides e diploides entre si. Na presença de etanol, ambas as linhagens apresentaram maior expressão de genes envolvidos na captação de ergosterol e na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa, bem como na biogênese de ribossomos. Além destes, em altas concentrações de etanol, notou-se que todas as linhagens apresentavam repressão para a biossíntese de diversos aminoácidos, o que pode explicar a baixa taxa de crescimento celular específico observado. Quando comparadas as linhagens quanto à ploidia, alguns genes apresentaram-se diferencialmente expressos, mas pouca correlação foi observada quanto à tolerância a etanol, salvo exceção de alguns genes relacionados à estabilidade de parede celular. Córdova e colegas<sup>125</sup> compararam a expressão diferencial de duas linhagens de *S. cerevisiae* (uma linhagem laboratorial nunca exposta à fermentação de tequila e uma linhagem comumente utilizada nesse processo), e verificaram que genes relacionados à composição lipídica da membrana e captação de ergosterol eram significativamente mais expressos na linhagem adaptada.

Sabe-se que fatores de transcrição são elementos importantes na coordenação do transcriptoma, sendo responsáveis por ativar ou inativar até centenas de genes, através de ações cooperativas ou exclusivas. Os fatores de transcrição Msn2p e Msn4p, de *S. cerevisiae*, são responsáveis por coordenar e controlar a expressão de mais de 200 genes envolvidos em respostas a estresses oxidativo, por temperatura, por etanol e outros<sup>126,127</sup>. A deleção de ambos os fatores de transcrição torna a levedura hipersensível ao estresse por etanol<sup>128,129</sup>, enquanto sua superexpressão implica em fenótipo mais tolerante<sup>130</sup>. Além disso, a translocação nuclear de Msn2/4p é mediada por fosforilação e Vamvakas e colaboradores mostraram que a simples substituição de resíduos pontuais de serina por alanina era capaz de afetar a tolerância ao etanol bem como rendimento da fermentação<sup>131</sup>. É importante notar que a ativação de Msn2/4p deve ocorrer apenas sob estresse, uma vez que sua constante ativação – mimetizada pela

substituição de seis resíduos de serina por alanina – afeta todo o metabolismo, tornando a levedura inviável<sup>132</sup>.

O gene *YAP1* codifica um fator de transcrição de resposta característica ao estresse oxidativo<sup>133</sup> e como o etanol pode promover a produção de espécies reativas de oxigênio, Yap1p também atua na resposta ao estresse por etanol<sup>134</sup>. Zyrina e colaboradores<sup>105</sup> avaliaram a relação entre Sod2p e Yap1p, verificando que a produção de peróxido de hidrogênio por Sod2p, a partir da redução de superóxidos, é essencial para a ativação desse fator de transcrição por meio da oxidação e consequente formação de pontes dissulfeto<sup>135</sup>. Screenings em linhagens de mutantes de *S. cerevisiae* apontam que a deleção de *YAP1* aumenta a sensibilidade da levedura ao estresse oxidativo<sup>136</sup>. Em contrapartida, as deleções únicas de catalases (*CTT1* e *CTA1*), superóxido dismutases (*SOD1* e *SOD2*) ou mesmo proteínas do sistema tiorredoxina (*TSA1*, *TRX2* e *TRR1*) pouco ou nada afetam a sensibilidade ao estresse<sup>136</sup>, indicando que a coordenação da expressão do sistema de adaptação é mais importante que a existência de todos os elementos. Em *S. cerevisiae*, na presença de etanol, é possível observar aumento da expressão de alvos de Hsf1p; entretanto, sua expressão pouco varia, sendo o controle da expressão dependente da homotrimerização e fosforilação<sup>137</sup>. Apesar disso, a hiperfosforilação desregulada implica em baixa funcionalidade de Hsf1p (por mecanismos ainda desconhecidos), levando a defeitos fisiológicos na resposta ao etanol<sup>138</sup>. Em contrapartida, a deleção de outros fatores de transcrição, como *ACE2* e *SWI5*, proporciona aumento da produtividade de etanol por meio da expressão diferencial de genes envolvidos com metabolismo de carbono e mecanismos de resposta ao estresse<sup>139</sup>.

Dessa forma, a multiplicidade e complexidade de mecanismos de controle transcricional precisa ser melhor compreendida. Um amplo estudo funcional dos efeitos fisiológicos da superexpressão de fatores de transcrição verificou que 61 desses apresentavam efeitos tóxicos<sup>140</sup>. Assim, estudos recentes fazem uso de engenharia global da máquina de transcrição (*global transcription machinery engineering*, gTME), uma abordagem que foca na reprogramação da transcrição gênica, por meio de mutações

randômicas em proteínas específicas e screening de linhagens com fenótipo de interesse<sup>141,142</sup>. Experimentos de gTME realizados com Spt15p (TATA-box binding protein), fator de transcrição responsável por coordenar a expressão de vários genes, promoveram mutações na sequência do gene por meio de *error prone* PCR. Entre os transformantes, foram identificados alguns com capacidade fermentativa e tolerância a etanol aumentados, indicando o impacto de alterações na estrutura de fatores de transcrição<sup>141,143</sup>. Qiu e Jiang<sup>144</sup> utilizaram a mesma abordagem com o gene *RPB7* - subunidade da RNA polimerase II. Ao realizar o screening dos mutantes obtidos, foi identificado um que apresentava aumento do rendimento e da tolerância ao etanol. Ao avaliar a expressão gênica, verificaram que essas alterações culminavam na expressão diferencial de 369 genes, com funções no metabolismo de carboidrato, na resposta ao estresse oxidativo e na regulação transcricional.

Além de explorar características naturais de *S. cerevisiae* ou induzir modificações artificiais em proteínas, a expressão heteróloga também é uma abordagem de interesse. Li e equipe<sup>145</sup> transformaram linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae* (BY4743) com os genes *MSN2* e *HSF1* de *Kluyveromyces marxianus*, obtendo uma linhagem termotolerante. Essa linhagem era capaz de fermentar eficientemente em temperaturas elevadas (e.g., 42 °C), com rendimentos superiores à linhagem controle. Análises de transcriptômica apontaram que mais de 50 genes estavam diferencialmente expressos, afetando processos fisiológicos variados.

Juntos, esses trabalhos reforçam a importância do controle da transcrição para determinação de características fisiológicas. Os estudos de superexpressão, deleção, modificações pós-traducionais e mutações dessas proteínas sinalizam que o robusto controle da expressão gênica de múltiplos alvos é essencial para a aquisição de determinada resposta celular. É possível observar que a up- ou down-regulação de um conjunto de genes, sem modificação de suas sequências, é o suficiente para promover o aumento da tolerância ao etanol ou da capacidade fermentativa. Assim, o estudo mais profundo do papel dos fatores de transcrição em processos celulares é essencial para a obtenção de linhagens de leveduras mais

adaptadas às condições industriais, principalmente de organismos não-convencionais de interesse biotecnológico. Enquanto a modificação ou expressão de proteínas pode afetar um conjunto limitado de alvos e processos, a alteração de fatores de transcrição pode influenciar redes extensas de centenas de genes, controlando a resposta fisiológica como um todo.

## **PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES**

O etanol afeta, direta ou indiretamente, diversas estruturas e processos celulares de leveduras, comprometendo sua viabilidade e eficiência fermentativa. Dentre as principais estruturas afetadas, estão as membranas celulares e de organelas, que sofrem com um processo de fluidização. Tal fluidização permite, por exemplo, a acidificação do citosol e a desestruturação de cristas mitocondriais. Por consequência, diversos mecanismos são afetados, como a redução da eficiência da síntese de ATP mitocondrial, seguido de maior geração de ROS; formação de agregados proteicos, devido ao mau-dobramento das proteínas expostas ao etanol; redução da taxa de transporte de metabólitos; e dissipação do potencial eletroquímico transmembrana. Esse amplo comprometimento da homeostase celular é o gatilho para a iniciação de uma série de respostas, a fim de tentar promover a sobrevivência celular (Figura 2; Tabela 1). Dentre tais respostas, está a ativação da expressão de diversos genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e glutatona reduzida que promovem a depleção de ROS; biossíntese e acúmulo de trealose; bombas de próton transmembrana (citosólica e vacuolar) para reduzir a acidificação do citosol; HSPs envolvidas no processo de desagregação protéica, estabilização de membranas e controle do consumo de ATP por bombas de prótons; ativação da via de resposta a proteínas mal-dobradas; mudança na composição lipídica de membranas; e biogênese de *clusters* Fe-S, componentes de proteínas da cadeia transportadora de elétrons.

**Tabela 1.** Genes e metabólitos envolvidos na tolerância ao etanol.

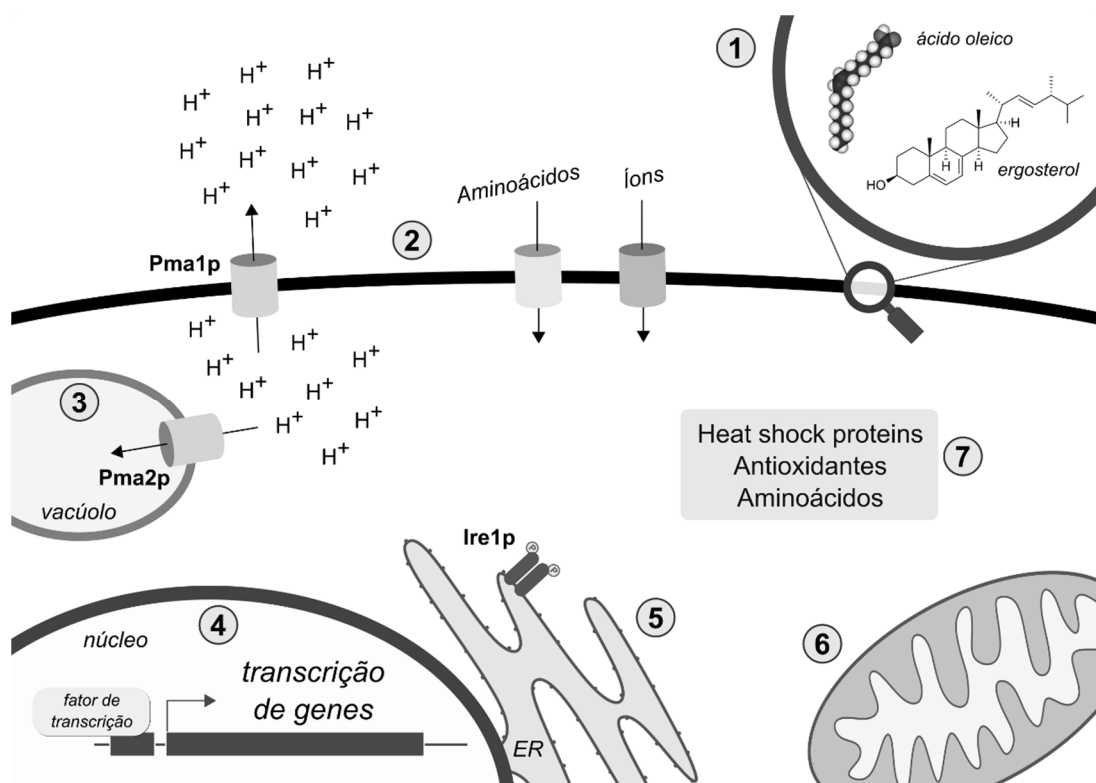
<b>ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA MEMBRANA</b>		
<b>Gene / Metabólito</b>	<b>Descrição</b>	<b>Ref.</b>
Fosfatidilcolina	Maior concentração desse fosfolípídeo de membrana implica em maior tolerância a etanol e capacidade de crescimento frente ao estresse.	6,21
Inositol	Suplementação do meio de cultura com inositol aumenta a viabilidade celular por meio da redução da permeabilidade da membrana na presença do etanol.	25
Ácidos graxos e ergosterol / <i>OLE1</i>	Ácidos graxos insaturados e ergosterol estabilizam a estrutura da membrana, aumentando sua resistência à solubilização ao etanol. O aumento da expressão de <i>OLE1</i> (ácido graxo insaturase) aumenta a biossíntese de ácidos graxos insaturados e consequente tolerância ao etanol.	26, 28, 29
<b>TRANSPORTE DE ÍONS E ACIDIFICAÇÃO CELULAR</b>		
<b>Gene / Metabólito</b>	<b>Descrição</b>	<b>Ref.</b>
<i>PMA1</i> / <i>PMA2</i>	As H <sup>+</sup> -ATPases de membrana promovem a desacidificação do citosol por meio do efluxo de prótons. Linhagens mais tolerantes de <i>S. cerevisiae</i> apresentam maior expressão desses genes. Superexpressão de <i>PMA1</i> aumenta a tolerância de leveduras a diversos tipos de estresse.	7, 33, 43
Ca <sup>2+</sup>	O influxo de Ca <sup>2+</sup> , por meio de transportadores de membrana, ativa vias de sinalização que culminam em respostas a estresses. No retículo endoplasmático, Ca <sup>2+</sup> é essencial para retenção de proteínas, garantindo adequado dobramento e processamento	51, 53
Mg <sup>2+</sup>	O íon Mg <sup>2+</sup> contribui para estabilidade de biopolímeros e funciona como cofator de diversas enzimas. A suplementação do meio com magnésio aumentou tolerância ao etanol, afetando a expressão de diversos genes.	56, 39

**Tabela 1.** Continuação...

Trealose	Dissacarídeo não-redutor. Seu acúmulo promove estabilização de proteínas e membranas, além de contribuir para a eficiência na resposta antioxidante. A superexpressão de TPS1, gene envolvido na biossíntese de trealose, leva a maior eficiência fermentativa e tolerância ao etanol.	107-109, 111
Aminoácidos	A biossíntese e o transporte de aminoácidos estão intimamente relacionados a tolerância ao etanol. A deleção de genes de biossíntese ou o comprometimento da importação de aminoácidos em <i>S. cerevisiae</i> reduz a tolerância ao etanol, enquanto a suplementação desses em meio de fermentação reestabelece o estado fisiológico celular.	13, 97-99, 113, 120
<b>MAU-DOBRAMENTO PROTEICO, VIA UPR e CHAPERONAS</b>		
Gene / Metabólito	Descrição	Ref.
<i>HSP12, HSP26, HSP42</i>	Linhagens mais tolerantes de <i>S. cerevisiae</i> apresentaram maior expressão dessas chaperonas. Hsp12p está correlacionada à proteção da membrana celular, impedindo a dessecação da levedura. Hsp26p e Hsp42p suprimem a formação de agregados proteicos.	11, 18, 78, 81, 82
<i>HSP30</i>	Chaperona de membrana plasmática, regula negativamente a atividade de Pma1p (bomba de prótons). O aumento da concentração de etanol leva ao aumento da expressão de <i>HSP30</i> , que controla o consumo de ATP pela H <sup>+</sup> -ATPase.	74, 75
<i>HSP104</i>	Disagregase essencial para garantia da homeostase celular. Promove a desagregação e contribui para o re-novelamento de proteínas em diversos tipos de estresse. A deleção dessa chaperona reduz a tolerância ao etanol.	85-87
<i>APJ1</i>	Chaperona putativa da família Hsp40. Sua deleção promove aumento da tolerância ao etanol em <i>S. cerevisiae</i> , por mecanismos ainda não-esclarecidos.	147

**Tabela 1.** Continuação...

<b>MITOCÔNDRIA, METABÓLITOS E TOLERÂNCIA A ETANOL</b>		
<b>Gene / Metabólito</b>	<b>Descrição</b>	<b>Ref.</b>
Glutationa	Peptídeo com atividade antioxidante quando na forma reduzida. Linhagens incapazes de reduzir glutaciona oxidada são mais sensíveis a estresses oxidativos. Altas concentrações de etanol apresentam maior formação de ROS, que levam a redução da disponibilidade de glutaciona reduzida.	92,96
<i>SOD2</i>	Superóxido dismutase mitocondrial. Essas enzimas são responsáveis por reduzir espécies reativas de oxigênio, contribuindo para manutenção da homeostase celular. Sua deleção compromete a adaptação fisiológica ao etanol, afetando até mesmo a ativação de fatores de transcrição.	104, 105
<b>FATORES DE TRANSCRIÇÃO</b>		
<b>Gene / Metabólito</b>	<b>Descrição</b>	<b>Ref.</b>
<i>MSN2</i> e <i>MSN4</i>	Coordenam e controlam a expressão de mais de 200 genes envolvidos em respostas a estresses oxidativo, por temperatura, por etanol e outros. A deleção de ambos torna a célula hipersensível aos estresses.	128-130
<i>YAP1</i>	Responsivo a estresse oxidativo e outros estresses que levam a formação de ROS. Sua ativação depende de <i>SOD2</i> e da formação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Sua deleção afeta a resposta ao estresse oxidativo, uma vez que coordena a expressão de catalases, superóxido dismutases e outras proteínas com potencial redutor.	105, 135, 136
<i>HSF1</i>	Responsivo a estresse térmico e à presença de proteínas mal-dobradas. Sua hiperfosforilação reduz a resposta ao estresse por etanol e sua deleção é letal para <i>S. cerevisiae</i> .	138, 146



**Figura 2.** Mecanismos utilizados para tolerância a etanol em leveduras. **1)** Uma estratégia amplamente observada envolve a alteração da composição lipídica da membrana celular, a fim de minimizar os impactos intracelulares da presença de etanol. De forma geral, observa-se o aumento da concentração de ácidos graxos insaturados de cadeia longa (e.g., ácido oleico) e ergosterol, que diminuem a fluidez da membrana. **2)** A utilização de bombas de próton na membrana externa (e.g., Pma1 e Pma2) contribuem para o efluxo de prótons, reduzindo o efeito da acidificação citosólica e reestabelecendo parcialmente o potencial eletroquímico essencial para diferentes processos. Além disso, a presença de transportadores de íons, como cálcio e magnésio, permite a manutenção de processos celulares e vias de sinalização essenciais, permitindo a adaptação celular ao estresse. **3)** Além das bombas de próton localizadas na membrana externa, as localizadas no vacúolo (V-ATPases) também são essenciais para manutenção da viabilidade celular; frente ao estresse por etanol, a célula promove a fusão e formação de um único e amplo vacúolo, que promove o fluxo de prótons citosol → vacúolo. **4)** A formação de agregados proteicos ou de proteínas recém-sintetizadas mal-dobradas promove a ativação da via UPR, que desencadeia uma série de eventos para promoção do redobramento proteico e degradação de componentes não-recuperáveis. Além disso, a via UPR desencadeia a ativação de diferentes genes essenciais para reestabelecimento da homeostase celular. **5)** A mitocôndria, estrutura que intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na presença de etanol, busca contornar o estresse oxidativo causado através da formação de glutatona reduzida bem como na promoção da biogênese de *clusters* Fe-S, estruturas essenciais nas proteínas da cadeia transportadora de elétrons. Tais abordagens promovem a redução de ROS já formados além de minimizar a geração de mais ROS, atenuando o

escape de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons. 6) O estresse por etanol desencadeia a expressão de uma diversidade de genes, como codificadores de HSPs, bombas de prótons, metabolismo de aminoácidos, biogênese de ribossomos, além de fatores de transcrição, como *MSN2* e *MSN4*, envolvidos na ativação de promotores de genes envolvidos a diferentes estresses. 7) HSPs desempenham diversos papéis para adaptação da célula frente ao estresse, como proteção contra dissecação, redobramento e desagregação proteica, regulação de transportadores de membrana, dentre outros. Antioxidantes, como glutatona, são também essenciais para controle dos danos causados por ROS, garantindo o balanço de componentes (como NADP<sup>+</sup> e NADPH) e minimizando o impacto causado em moléculas e estruturas celulares. Aminoácidos também desempenham papel similar, podendo promover a remoção de ROS diretamente, através de reações químicas. Além disso, alguns aminoácidos são essenciais para a ativação de vias de sinalização (*e.g.*, a via UPR é dependente de prolina) e biossíntese de componentes celulares essenciais (*e.g.*, síntese de NAD(P) a partir de triptofano como precursor). O acúmulo de trealose também contribui para manutenção da homeostase celular.

Dessa forma, compreender os mecanismos envolvidos na tolerância a etanol contribui para o desenvolvimento de novas linhagens de leveduras fermentadoras ou para o aperfeiçoamento de linhagens já bem estabelecidas, garantindo maior eficiência na produção de etanol 1G e 2G. Entretanto, a complexidade de respostas e a diferença de adaptação ao etanol em diferentes organismos, principalmente não-*Saccharomyces*, apresentam-se como maior desafio para compreensão exata e plena do processo de tolerância. É curioso notar que grande parte das melhorias observadas para a tolerância ao etanol são mais relacionados à expressão gênica do que à estrutura de proteínas de resposta. Estudos de modelagem integrados a análises do transcriptoma de organismos tolerantes e sensíveis ao etanol podem evidenciar conjuntos de genes essenciais para a aquisição da tolerância ao etanol. A partir disso, ferramentas de engenharia genética podem ser utilizadas para desenvolver novas linhagens que coordenem de forma precisa a expressão de genes-chave.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Basic, A. *et al.* Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol Biotechnol.* 2018;56(3):289-311.
2. Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., Faruq, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2016;66:751-774.
3. Mohd Azhar, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Rep.* 2017;10:52-61.
4. Lin, Y., Tanaka, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;69(6):627-642.
5. Pina, C., Couto, J. A., Hogg, T. Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. *Biotechnol Lett.* 2004;26(19):1521-1527.
6. Henderson, C. M., Lozada-Contreras, M., Jiranek, V., Longo, M. L., Block, D. E. Ethanol production and maximum cell growth are highly correlated with membrane lipid composition during fermentation as determined by lipidomic analysis of 22 *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(1):91-104.
7. Fernandes, A. R., Sa-Correia, I. Transcription patterns of *PMA1* and *PMA2* genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast.* 2003;20(3):207-219.
8. Auesukaree, C. *et al.* Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet.* 2009;50(3):301-310.
9. Swinnen, S. *et al.* Auxotrophic Mutations Reduce Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to Very High Levels of Ethanol Stress. *Eukaryot Cell.* 2015;14(9):884-897.
10. Takagi, H. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;81(2):211-223.
11. Navarro-Tapia, E., Nana, R. K., Querol, A., Perez-Torrado, R. Ethanol Cellular Defense Induce Unfolded Protein Response in Yeast. *Front Microbiol.* 2016;7:189.
12. Kim, S. *et al.* Elucidation of ethanol tolerance mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* by global metabolite profiling. *Biotechnol J.* 2016;11(9):1221-1229.
13. Ohta, E., Nakayama, Y., Mukai, Y., Bamba, T., Fukusaki, E. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 2016;121(4):399-405.

14. Caspeta, L., Castillo, T., Nielsen, J. Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3.
15. Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., Stanley, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 2010;109(1):13-24.
16. Ding, J., Huang, X., Zhao, N., Gao, F., Lu, Q., Zhang, K. Q. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress involves actions of protein Asr1p. *J Microbiol Biotechnol.* 2010;20(12):1630-1636.
17. Ishmayana, S., Kennedy, U. J., Learmonth, R. P. Further investigation of relationships between membrane fluidity and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(12):218.
18. Navarro-Tapia, E., Perez-Torrado, R., Querol, A. Ethanol Effects Involve Non-canonical Unfolded Protein Response Activation in Yeast Cells. *Front Microbiol.* 2017;8:383.
19. Lahtvee, P. J., Kumar, R., Hallstrom, B. M., Nielsen, J. Adaptation to different types of stress converge on mitochondrial metabolism. *Mol Biol Cell.* 2016;27(15):2505-2514.
20. Gasch, A. P. *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 2000;11(12):4241-4257.
21. Henderson, C. M., Block, D. E. Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(10):2966-2972.
22. Huffer, S., Clark, M. E., Ning, J. C., Blanch, H. W., Clark, D. S. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6400-6408.
23. Ma, M., Liu, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(3):829-845.
24. Zhou, Q., Liu, Z. L., Ning, K., Wang, A., Zeng, X., Xu, J. Genomic and transcriptome analyses reveal that MAPK- and phosphatidylinositol-signaling pathways mediate tolerance to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde for industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* 2014;4:6556.
25. Furukawa, K., Kitano, H., Mizoguchi, H., Hara, S. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *J Biosci Bioeng.* 2004;98(2):107-113.
26. Vanegas, J. M., Contreras, M. F., Faller, R., Longo, M. L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. *Biophys J.* 2012;102(3):507-516.
27. Wang, Y., Zhang, S., Liu, H., Zhang, L., Yi, C., Li, H. Changes and roles of membrane compositions in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. *J Basic Microbiol.* 2015;55(12):1417-1426.

28. Dong, S. J., Yi, C. F., Li, H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;69:196-203.
29. Archana, K. M., Ravi, R., Anu-Appaiah, K. A. Correlation between ethanol stress and cellular fatty acid composition of alcohol producing non-*Saccharomyces* in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* by multivariate techniques. *J Food Sci Technol.* 2015;52(10):6770-6776.
30. Arroyo-Lopez, F. N., Salvado, Z., Tronchoni, J., Guillamon, J. M., Barrio, E., Querol, A. Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast.* 2010;27(12):1005-1015.
31. Mannazzu, I. *et al.* Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int J Food Microbiol.* 2008;121(1):84-91.
32. Thomas, D. S., Rose, A. H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch Microbiol.* 1979;122(1):49-55.
33. Aguilera, F., Peinado, R. A., Millan, C., Ortega, J. M., Mauricio, J. C. Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol.* 2006;110(1):34-42.
34. Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;124(1):17-22.
35. Ma, M., Liu, L. Z. Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* 2010;10:169.
36. Diniz, R. H. S. *et al.* Transcriptome analysis of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 under ethanol stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(18):6969-6980.
37. Auesukaree, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J Biosci Bioeng.* 2017;124(2):133-142.
38. Busti, S. *et al.* Respiratory metabolism and calorie restriction relieve persistent endoplasmic reticulum stress induced by calcium shortage in yeast. *Sci Rep.* 2016;6:27942.
39. Souza, R. B., Silva, R. K., Ferreira, D. S., Paiva Junior S. S. L., Pita, W. B., Morais Junior, M. A. Magnesium ions in yeast: setting free the metabolism from glucose catabolite repression. *Metallomics.* 2016;8(11):1193-1203.
40. Nguyen, H. P., Du Le, H., Man Le, V. V. Effect of Ethanol Stress on Fermentation Performance of *Saccharomyces cerevisiae* Cells

- Immobilized on *Nypa fruticans* Leaf Sheath Pieces. *Food Technol Biotechnol.* 2015;53(1):96-101.
41. Ke, R., Ingram, P. J., Haynes, K. An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(1):e1002879.
  42. Ferreira, T., Mason, A. B., Slayman, C. W. The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. *J Biol Chem.* 2001;276(32):29613-29616.
  43. Lee, Y., Nasution, O., Lee, Y. M., Kim, E., Choi, W., Kim, W. Overexpression of *PMA1* enhances tolerance to various types of stress and constitutively activates the SAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(1):229-239.
  44. Eraso, P., Mazon, M. J., Posas, F., Portillo, F. Gene expression profiling of yeasts overexpressing wild type or misfolded Pma1 variants reveals activation of the Hog1 MAPK pathway. *Mol Microbiol.* 2011;79(5):1339-1352.
  45. Posas, F., Saito, H. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *Embo j.* 1998;17(5):1385-1394.
  46. Brewster, J. L., Gustin, M. C. Hog1: 20 years of discovery and impact. *Sci Signal.* 2014;7(343):re7.
  47. Ma, M., Han, P., Zhang, R., Li, H. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. *Can J Microbiol.* 2013;59(9):589-597.
  48. Wang, H., Liang, Y., Zhang, B., Zheng, W., Xing, L., Li, M. Alkaline stress triggers an immediate calcium fluctuation in *Candida albicans* mediated by Rim101p and Crz1p transcription factors. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(5):430-439.
  49. Serra-Cardona, A., Canadell, D., Arino, J. Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. *Microb Cell.* 2015;2(6):182-196.
  50. Zeeshan, H. M., Lee, G. H., Kim, H. R., Chae, H. J. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):327.
  51. Courchesne, W. E., Vlasek, C., Klukovich, R., Coffee, S. Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 2011;193(5):323-334.
  52. Cyert, M. S., Philpott, C. C. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2013;193(3):677-713.
  53. Durr, G. *et al.* The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell.* 1998;9(5):1149-1162.
  54. Puigpinos, J., Casas, C., Herrero, E. Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in

- Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin. *Mol Biol Cell*. 2015;26(1):104-116.
55. Ruta, L. L. *et al.* Calcium signaling mediates the response to cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3202-3212.
  56. da Costa, B. M., Cornish, K., Keasling, J. D. Manipulation of intracellular magnesium levels in *Saccharomyces cerevisiae* with deletion of magnesium transporters. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77(2):411-425.
  57. Birch, R. M., Walker, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*. 2000;26(9-10):678-687.
  58. Dombek, K. M., Ingram, L. O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 1986;52(5):975-981.
  59. Lam, F. H., Ghaderi, A., Fink, G. R, Stephanopoulos, G. Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science*. 2014;346(6205):71-75.
  60. Wickner, W., Schekman, R. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 2005;310(5753):1452-1456.
  61. Miyagawa, K., Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K., Kimata, Y. Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014;78(8):1389-1391.
  62. Schroder, M., Kaufman, R. J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005;569(1-2):29-63.
  63. Walter, P., Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-1086.
  64. Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., Kohno, K. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells*. 2006;11(1):59-69.
  65. Chawla, A., Chakrabarti, S., Ghosh, G., Niwa, M. Attenuation of yeast UPR is essential for survival and is mediated by IRE1 kinase. *J Cell Biol*. 2011;193(1):41-50.
  66. Wu, H., Ng, B. S., Thibault, G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep*. 2014;34(4).
  67. Tabas, I., Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011;13(3):184-190.
  68. Bernales, S., McDonald, K. L., Walter, P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol*. 2006;4(12):e423.
  69. Promlek, T., Ishiwata-Kimata, Y., Shido, M., Sakuramoto, M., Kohno, K., Kimata, Y. Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the

- endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol Biol Cell*. 2011;22(18):3520-3532.
70. Lajoie, P., Moir, R. D., Willis, I. M., Snapp, E. L. Kar2p availability defines distinct forms of endoplasmic reticulum stress in living cells. *Mol Biol Cell*. 2012;23(5):955-964.
  71. Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K. A. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):115-158.
  72. Ritossa, F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(2):97-98.
  73. Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 2001;498(1):98-103.
  74. Piper, P. W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;134(2-3):121-127.
  75. Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., Cole, M. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones*. 1997;2(1):12-24.
  76. Lv, Y. J. *et al*. Proteomic analysis reveals complex metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells against multiple inhibitors stress. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(5):2207-2221.
  77. Sakurai, H., Ota, A. Regulation of chaperone gene expression by heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*: importance in normal cell growth, stress resistance, and longevity. *FEBS Lett*. 2011;585(17):2744-2748.
  78. Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., Lindsey, G. The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1463(2):267-278.
  79. Jain, N. K., Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*. 2009;18(1):24-36.
  80. Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A., Lindquist, S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*. 1994;372(6505):475-478.
  81. Haslbeck, M. *et al*. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo j*. 2004;23(3):638-649.
  82. Haslbeck, M. *et al*. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *Embo j*. 1999;18(23):6744-6751.

83. Tiroli-Cepeda, A. O., Ramos, C. H. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Protein Pept Lett.* 2011;18(2):101-109.
84. Farrugia, G., Balzan, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol.* 2012;2:64.
85. Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A., Lindquist, S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* 1992;11(6):2357-2364.
86. Bond, U. Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(2):160-170.
87. Kempf, C., Lengeler, K., Wendland, J. Differential stress response of *Saccharomyces* hybrids revealed by monitoring Hsp104 aggregation and disaggregation. *Microbiol Res.* 2017;200:53-63.
88. Grably, M. R., Stanhill, A., Tell, O., Engelberg, D. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast *HSP104* gene. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):21-35.
89. Aerts, A. M. *et al.* Mitochondrial dysfunction leads to reduced chronological lifespan and increased apoptosis in yeast. *FEBS Lett.* 2009;583(1):113-117.
90. Deffieu, M., Bhatia-Kissova, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S., Camougrand, N. Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14828-14837.
91. Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(6):892-898.
92. Perez-Gallardo, R. V., Briones, L. S., Diaz-Perez, A. L., Gutierrez, S., Rodriguez-Zavala, J. S., Campos-Garcia, J. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(8):804-819.
93. Jamieson, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998;14(16):1511-1527.
94. Drakulic, T. *et al.* Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2005;5(12):1215-1228.
95. Perrone, G. G., Tan, S. X., Dawes, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(7):1354-1368.
96. Gostimskaya, I., Grant, C. M. Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system. *Free Radic Biol Med.* 2016;94:55-65.
97. Lewis, J. A., Elkon, I. M., McGee, M. A., Higbee, A. J., Gasch, A. P. Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify

- genes for increased ethanol resistance. *Genetics*. 2010;186(4):1197-1205.
98. Takagi, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A., Kubo, Y. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8656-8662.
  99. Cheng, Y., Du, Z., Zhu, H., Guo, X., He, X. Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. *Sci Rep*. 2016;6.
  100. Guaragnella, N., Zdravlevic, M., Antonacci, L., Passarella, S., Marra, E., Giannattasio, S. The role of mitochondria in yeast programmed cell death. *Front Oncol*. 2012;2:70.
  101. Dos Santos, P. C., Dean, D. R. Bioinorganic chemistry: electrons in Fe-S protein assembly. In: *Nat Chem Biol*. Vol 6. United States 2010:700-701.
  102. Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., Brand, M. D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*. 2010;47:53-67.
  103. Outten, C. E., Falk, R. L., Culotta, V. C. Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 2005;388(Pt 1):93-101.
  104. Costa, V., Amorim, M. A., Reis, E., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*. 1997;143 ( Pt 5):1649-1656.
  105. Zyrina, A. N., Smirnova, E. A., Markova, O. V., Severin, F. F., Knorre, D. A. Mitochondrial Superoxide Dismutase and Yap1p Act as a Signaling Module Contributing to Ethanol Tolerance of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(3).
  106. Nwaka, S., Holzer, H. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998;58:197-237.
  107. Mahmud, S. A., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Shimizu, H. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2009;26(1):17-30.
  108. Wang, P. M. *et al*. Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Bioresour Technol*. 2014;152:371-376.
  109. Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., Stanley, G. A. Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. *FEMS Yeast Res*. 2009;9(8):1208-1216.
  110. Divate, N. R., Chen, G. H., Divate, R. D., Ou, B. R., Chung, Y. C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. *Bioengineered*. 2017;8(5):524-535.

111. Divate, N. R., Chen, G. H., Wang, P. M., Ou, B. R., Chung, Y. C. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in ethanol tolerance by accumulation of trehalose. *Bioengineered*. 2016;7(6):445-458.
112. Moon, M. H., Ryu, J., Choeng, Y., Hong, S., Kang, H. A., Chang, Y. K. Enhancement of stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a trehalose biosynthetic gene from *Streptomyces albus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012;17(5):986-996.
113. Kasavi, C., Eraslan, S., Arga, K. Y., Oner, E. T., Kirdar, B. A system based network approach to ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol*. 2014;8:90.
114. Hirasawa, T. *et al.* Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J Biotechnol*. 2007;131(1):34-44.
115. Kurnasov, O. *et al.* NAD Biosynthesis: Identification of the Tryptophan to Quinolinate Pathway in Bacteria. *Chemistry & Biology*. 2003;10(12):1195-1204.
116. Campbell, K., Vowinckel, J., Keller, M. A., Ralser, M. Methionine Metabolism Alters Oxidative Stress Resistance via the Pentose Phosphate Pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(10):543-547.
117. Takagi, H., Taguchi, J., Kaino, T. Proline accumulation protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase from ethanol stress by reducing reactive oxygen species levels. *Yeast*. 2016;33(8):355-363.
118. Trelstad, R. L., Lawley, K. R., Holmes, L. B. Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine by reduced oxygen derivatives. *Nature*. 1981;289(5795):310-312.
119. Kaul, S., Sharma, S. S., Mehta, I. K. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids*. 2008;34(2):315-320.
120. Liang, X., Dickman, M. B., Becker, D. F. Proline biosynthesis is required for endoplasmic reticulum stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2014;289(40):27794-27806.
121. Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y., Takagi, H. An antioxidative mechanism mediated by the yeast N-acetyltransferase Mpr1: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res*. 2010;10(6):687-698.
122. Li, H., Ma, M. L., Luo, S., Zhang, R. M., Han, P., Hu, W. Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(7):1087-1096.
123. Dinh, T. N., Nagahisa, K., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H. Analysis of adaptation to high ethanol concentration in

- Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009;32(5):681-688.
124. Li, B. Z., Cheng, J. S., Ding, M. Z., Yuan, Y. J. Transcriptome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress. *J Biotechnol.* 2010;148(4):194-203.
  125. Ramirez-Cordova, J. *et al.* Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in Agave tequilana juice. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012;102(2):247-255.
  126. Estruch, F., Carlson, M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1993;13(7):3872-3881.
  127. Stewart-Ornstein, J., Nelson, C., DeRisi, J., Weissman, J. S., El-Samad, H. Msn2 coordinates a stoichiometric gene expression program. *Curr Biol.* 2013;23(23):2336-2345.
  128. Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo j.* 1996;15(9):2227-2235.
  129. Moskvina, E., Schuller, C., Maurer, C. T., Mager, W. H., Ruis, H. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast.* 1998;14(11):1041-1050.
  130. Watanabe, M., Watanabe, D., Akao, T., Shimoi, H. Overexpression of *MSN2* in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J Biosci Bioeng.* 2009;107(5):516-518.
  131. Vamvakas, S. S. *et al.* Specific serine residues of Msn2/4 are responsible for regulation of alcohol fermentation rates and ethanol resistance. *Biotechnol Prog.* 2018.
  132. Pfanzagl, V. *et al.* A constitutive active allele of the transcription factor Msn2 mimicking low PKA activity dictates metabolic remodeling in yeast. *Mol Biol Cell.* 2018;29(23):2848-2862.
  133. Herrero, E., Ros, J., Belli, G., Cabisco, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(11):1217-1235.
  134. Bleoanca, I., Silva, A. R., Pimentel, C., Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R. A. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(6):697-705.
  135. Tachibana, T., Okazaki, S., Murayama, A., Naganuma, A., Nomoto, A., Kuge, S. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2009;284(7):4464-4472.

136. Okada, N., Ogawa, J., Shima, J. Comprehensive analysis of genes involved in the oxidative stress tolerance using yeast heterozygous deletion collection. *FEMS Yeast Res.* 2014;14(3):425-434.
137. Hashikawa, N., Yamamoto, N., Sakurai, H. Different mechanisms are involved in the transcriptional activation by yeast heat shock transcription factor through two different types of heat shock elements. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10333-10340.
138. Noguchi, C., Watanabe, D., Zhou, Y., Akao, T., Shimoi, H. Association of constitutive hyperphosphorylation of Hsf1p with a defective ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(2):385-392.
139. Wu, Y., Du, J., Xu, G., Jiang, L. The transcription factor Ace2 and its paralog Swi5 regulate ethanol production during static fermentation through their targets Cts1 and Rps4a in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2016;16(3).
140. Youn, J. Y. *et al.* Functional Analysis of Kinases and Transcription Factors in *Saccharomyces cerevisiae* Using an Integrated Overexpression Library. *G3 (Bethesda).* 2017;7(3):911-921.
141. Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, E., Fink, G. R., Stephanopoulos, G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science.* 2006;314(5805):1565-1568.
142. Lanza, A. M., Alper, H. S. Using transcription machinery engineering to elicit complex cellular phenotypes. *Methods Mol Biol.* 2012;813:229-248.
143. El-Rotail, A., Zhang, L., Li, Y., Liu, S. P., Shi, G. Y. A novel constructed *SPT15* mutagenesis library of *Saccharomyces cerevisiae* by using gTME technique for enhanced ethanol production. *AMB Express.* 2017;7(1):111.
144. Qiu, Z., Jiang, R. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10.
145. Li, P., Fu, X., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Li, S. The transcription factors Hsf1 and Msn2 of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* promote cell growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* at high temperatures. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:289.
146. Bonner, J. J., Carlson, T., Fackenthal, D. L., Paddock, D., Storey, K., Lea, K. Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. *Mol Biol Cell.* 2000;11(5):1739-1751.
147. Swinnen, S. *et al.* Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res.* 2012;22(5):975-984.

## CAPÍTULO II

# **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DA DELEÇÃO DO GENE *APJ1* EM LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae***

## **Avaliação dos efeitos fisiológicos da deleção do gene *APJ1* em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***

### **RESUMO**

A produção de bioetanol em indústrias faz uso principalmente de leveduras em processos fermentativos. O etanol, produto da própria fermentação, é um dos principais limitantes da eficiência das leveduras. Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa buscam identificar mecanismos celulares e genes relacionados à adaptação ao estresse. Apj1p, possível chaperona envolvida na degradação de proteínas sumoiladas e na resposta ao acúmulo de príons, foi identificada como potencialmente relacionada à tolerância ao etanol em *Saccharomyces cerevisiae*. No presente estudo, foi avaliado o efeito da deleção de *APJ1* na fisiologia de linhagens de *S. cerevisiae*, a fim de compreender o impacto da mutação no crescimento sob a exposição a diversos estresses, como etanol, temperatura, elevada concentração de açúcar e presença de ácido acético. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as linhagens nos diferentes ensaios de crescimento ou fermentação. Além disso, o crescimento das células em meio contendo etanol foi similar, apesar do aumento da expressão de *APJ1* na linhagem background. Estudos anteriores de RNA-seq do nosso grupo revelaram pouca diferença entre os transcriptomas das leveduras sob estresse por etanol. Juntos, esses resultados apontam que os efeitos fisiológicos da deleção de *APJ1* em *S. cerevisiae* não estão diretamente relacionados a tolerância ao etanol e a outros estresses importantes para processos fermentativos.

**Palavras-chave:** Tolerância ao etanol; Chaperona; Estresse; Leveduras.

## REVISÃO DE LITERATURA

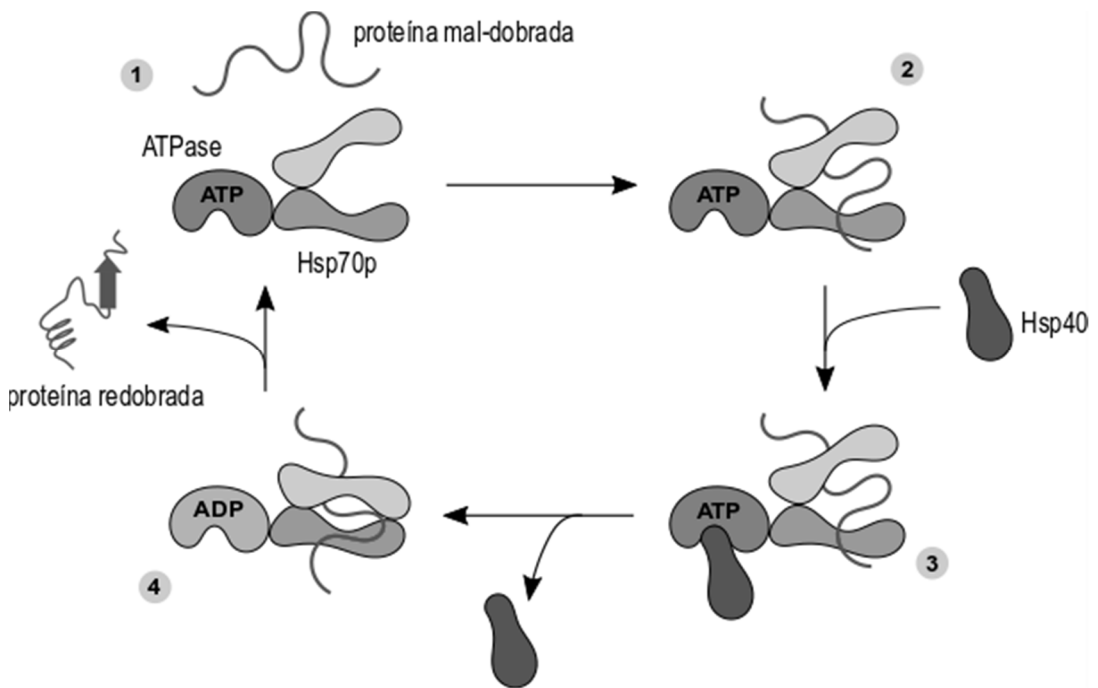
### Apj1p é uma chaperona putativa da família Hsp40

Proteínas da família Hsp40 apresentam um domínio característico conhecido como DnaJ, que contém cerca de 70 resíduos de aminoácidos estruturados em quatro  $\alpha$ -hélices. Além disso, há um motivo conservado “HPD” (histidina, prolina, ácido aspártico) entre as hélices II e III, essencial para a funcionalidade dessas proteínas<sup>1,2</sup>. De modo geral, chaperonas contendo domínio DnaJ atuam em colaboração com chaperonas da família Hsp70, proteínas essenciais que atuam na desagregação e redobramento proteico<sup>3,4</sup>.

Proteínas da família Hsp70 apresentam um domínio ATPase importante para sua atividade (Figura 1). Na ausência de condições de estresse, Hsp70s estão ligadas ao ATP em um estado de baixa afinidade ao substrato (proteínas-alvo). Na presença de proteínas mal-dobradas, essas chaperonas se ligam de forma transiente a segmentos ricos em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e, ao hidrolisarem o ATP, assumem um estado de alta afinidade ao substrato que permite a desagregação e o redobramento de proteínas em colaboração com outras chaperonas, como Hsp90s e Hsp100s<sup>3,4</sup>. Entretanto, a velocidade de hidrólise de ATP é a etapa limitante para a funcionalidade de Hsp70 e a associação com o domínio DnaJ de chaperonas Hsp40 é crucial para estimular a atividade do domínio ATPase<sup>1,2,5</sup>. Em leveduras, mais de vinte proteínas contendo DnaJ já foram identificadas<sup>3</sup>. Ydj1p é uma chaperona Hsp40 envolvida na degradação de proteínas via ubiquitinação e destinação ao proteassomo, na importação de proteínas para mitocôndria, na regulação da atividade de Hsp70s e na inibição da propagação de príons, como [SWI<sup>+</sup>] e [URE3]<sup>6-9</sup>. Sis1p apresenta papel similar na proteção da célula frente os efeitos tóxicos da propagação do príon [PSI<sup>+</sup>]<sup>10,11</sup>.

Apj1p (anti-prion DnaJ) foi inicialmente identificada por Kryndushkin e colaboradores como uma importante proteína para a contenção da propagação de príons, atuando na supressão e cura do fenótipo [PSI<sup>+</sup>]<sup>12</sup>. A análise estrutural apontou que essa proteína é uma

possível co-chaperona pertencente a família Hsp40. Estudos posteriores verificaram que essa chaperona também é capaz de propagar o príon [SWI<sup>+</sup>], atuando como substituta de Ydj1p<sup>13</sup>. Em contrapartida, a deleção de *APJ1* era letal para *S. cerevisiae*<sup>14</sup> ao avaliar modelos de propagação de agregados proteicos de fragmentos da proteína Huntingtin, um dos motivos causadores da doença de Huntington<sup>15</sup>. Assim, o efeito de Apj1p sob a propagação de príons parece ser dependente de suas estruturas e mecanismos de propagação.



**Figura 1.** Atividade de chaperonas das famílias Hsp40 e Hsp70 no redobramento e desagregação proteica. Proteínas da família Hsp70 possuem domínio ATPase e são capazes de reconhecer proteínas mal-dobradas, baseado na presença de regiões hidrofóbicas (1). Ao identificar esses alvos a serem redobrados e/ou desagregados, diversas chaperonas Hsp70 interagem com baixa afinidade com seus substratos (2). Associando-se a chaperonas Hsp40 (3), as chaperonas Hsp70 são estimuladas a hidrolisar o ATP e assumem uma nova conformação, de maior afinidade ao substrato (4). Após executarem suas funções, as chaperonas Hsp70 liberam as proteínas, agora em estado nativo ou desagregadas, e fazem a troca de ADP por ATP, ficando disponíveis para novos ciclos de atividade.

Apesar desses trabalhos avaliando o papel de Apj1p na propagação de príons, pouco se sabe sobre suas funções em outros processos celulares. É curioso notar que essa proteína é pouco abundante

na célula, apresentando pouco mais de 100 cópias<sup>16,17</sup>, e sua localização celular é discutida, sendo apontada como residente no citosol ou na mitocôndria<sup>17,18</sup>.

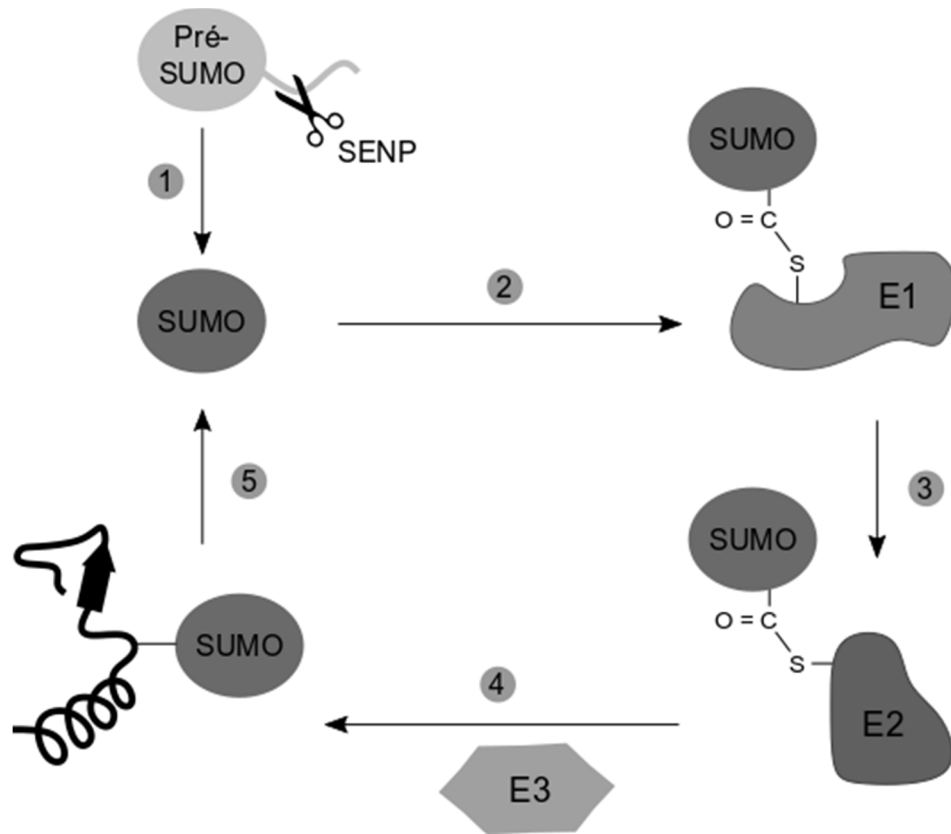
### **Apj1p está envolvida na degradação de proteínas sumoiladas e em processos fermentativos**

Análises filogenéticas apontam que o gene *APJ1* evoluiu de um ancestral comum, *YDJ1*, apresentando domínios conservados e capacidade de estimular a atividade da ATPase de chaperonas da família Hsp70. Entretanto, linhagens  $\Delta ydj1$  apresentam severas limitações de crescimento em meio sólido a 30 °C, enquanto nenhum efeito óbvio foi observado no crescimento de linhagens  $\Delta apj1$ <sup>17</sup>. Ao avaliar possíveis interações genéticas com *APJ1*, Sahi e colaboradores<sup>17</sup> identificaram que a linhagem duplo-mutante  $\Delta apj1\Delta slx5$  (Slx5p, subunidade do complexo proteico *SUMO-targeted Ubiquitin Ligase*) era incapaz de crescer em meio sólido a 37 °C. Considerando o papel de Slx5p na ubiquitinação de proteínas previamente sumoiladas, os pesquisadores confirmaram por análises de imunoblot um acúmulo de proteínas com essa modificação pós-traducional. Assim, proteínas que seriam ubiquitinadas e degradadas via proteassomo estavam sendo acumuladas no citosol<sup>19</sup>, sugerindo o papel de Apj1p no intermédio da degradação de proteínas sumoiladas.

A adição de SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) é uma modificação pós-traducional que ocorre em resíduos de lisina em sequências consenso de proteínas, e tal evento é essencial para diferentes processos celulares<sup>20</sup>. SUMOs têm origem em proteínas precursoras imaturas de 11 kDa, que precisam ser previamente processadas antes de serem conjugadas à proteína alvo. Assim, enzimas conhecidas por SENPs (*SUMO-specific proteases*) hidrolisam a porção C-terminal dessa proteína precursora de SUMO, permitindo o início do processo. A seguir, uma enzima ativadora de SUMO (E1) ativa o C-terminal de forma dependente de ATP. SUMO ativada é, então, transferida para uma enzima conjugadora (E2), responsável por assistir à ligação de SUMO no substrato pelas SUMO

ligases (E3). O processo de sumoilação é rapidamente reversível<sup>21,22</sup> (Figura 2).

A sumoilação pode estar envolvida em processos de degradação proteica, reparo de DNA, localização subcelular, regulação da atividade de fatores de transcrição e ligação a DNA, dentre outros<sup>23-25</sup>. Ainda assim, pouco se sabe sob os gatilhos que coordenam eventos de sumoilação e qual seu papel em processos de resposta a estresse. Entretanto, é importante ressaltar que os níveis de sumoilação em proteínas de leveduras aumentam drasticamente quando estas são submetidas a alguma condição de estresse, como etanol ou peróxido de hidrogênio<sup>26</sup>.



**Figura 2.** Processo de sumoilação de proteínas. O precursor da proteína SUMO (Pré-SUMO) é hidrolisado por proteases SENPs (1). O peptídeo SUMO maduro pode, então, se ligar a enzima ativadora de E1 (2). Após, SUMO ativo é transferido para a enzima conjugadora E2 (3). Por fim, de forma coordenada à enzima SUMO-ligase, proteínas-alvo são sumoiladas em resíduos de lisina em motivos sequência-específicos (4). O processo de sumoilação pode ser rapidamente revertido pelas SENPs por meio de hidrólise, e SUMO livre pode ser então utilizada para modificação pós-traducional de outros alvos (5).

Swinnen e colaboradores<sup>27</sup> verificaram, em análises de segregantes de leveduras resistentes e sensíveis ao etanol, que a redução da expressão de *APJ1* era um importante fator para aquisição da tolerância a altas concentrações de etanol ( $\geq 16\%$  v/v) em meio sólido. Para confirmar as observações, a deleção de *APJ1* foi feita em linhagem laboratorial de tolerância moderada ao estresse (BY4741) e segregante de linhagem industrial com alta tolerância ao estresse (VR1-5B). Para ambos os casos, as leveduras mutantes apresentaram crescimento superior às linhagens parentais em concentrações de etanol superiores a 10% (v/v) em meio sólido. Em 2014, uma patente aprovada<sup>28</sup> confirmou o uso da deleção de *APJ1* para melhorar a tolerância de leveduras em concentrações de etanol superiores a 14% (v/v).

De modo geral, a literatura é escassa quanto a estudos funcionais de Apj1p. Além desses trabalhos, pouca informação adicional é encontrada. Assim, o presente trabalho propôs avaliar o efeito da deleção de *APJ1* na tolerância ao etanol em linhagem laboratorial de *S. cerevisiae*, a fim de verificar o impacto dessa modificação no crescimento e fermentação.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos gerais**

Avaliar o efeito fisiológico da deleção de *APJ1* em *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições de crescimento.

### **Objetivos específicos**

- Analisar a expressão de *APJ1* em *S. cerevisiae* BY4741 na presença de estresse por etanol.
- Avaliar a tolerância ao etanol de linhagens de *S. cerevisiae* (BY4741 e Y02999) em meio sólido e líquido.
- Avaliar o efeito de temperatura, pH, concentração de açúcar e presença de ácido acético no crescimento de linhagens de *S. cerevisiae*.
- Comparar a capacidade fermentativa de linhagens de *S. cerevisiae*.

## METODOLOGIA

### Meios de cultura, leveduras e condições de cultivo

O meio de cultura YPD (20 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> peptona, 20 g.L<sup>-1</sup> glicose; para meio sólido, adicionar 20 g.L<sup>-1</sup> ágar) foi utilizado para a manutenção das células e preparo de pré-inóculos. O meio de cultura SC (6,7 g.L<sup>-1</sup> YNB, 20 g.L<sup>-1</sup> glicose, 20 g.L<sup>-1</sup> ágar; suplementado com 20 mg.L<sup>-1</sup> de adenina, arginina, histidina, metionina, triptofano e uracila; 30 mg.L<sup>-1</sup> de isoleucina, lisina e tirosina; 50 mg.L<sup>-1</sup> fenilalanina; 100 mg.L<sup>-1</sup> leucina; 150 mg.L<sup>-1</sup> valina; 200 mg.L<sup>-1</sup> treonina) foi utilizado para identificação de marcas auxotróficas.

Linhagens de *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) e Y02999 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 apj1Δ::KAN*) foram obtidas da coleção de micro-organismos da EUROSCARF (<http://euroscarf.de>). As células foram mantidas em estoque (-80 °C) em YPD e glicerol 15% (v/v). Periodicamente, as células foram cultivadas em meio sólido a 30 °C. Colônias isoladas foram utilizadas para preparo de pré-inóculos em 25 mL de meio YPD em frascos erlenmeyer (125 mL), a 30 °C e agitação de 150 rpm (Incubadora TE-420, Tecnal) por 16 horas. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas biológicas e as análises estatísticas foram feitas por meio de ANOVA seguido de teste Tukey de comparação de médias.

Para confirmar o genótipo das linhagens, ambas as linhagens de *S. cerevisiae* foram plaqueadas em meio SC-Ura, SC-Leu, SC-His e SC-Met para avaliação da auxotrofia, e em meio YPD-ágar adicionado de 50 – 250 µg.mL<sup>-1</sup> de Geneticin® (G418 sulfate, Invitrogen), para avaliação da resistência ao antibiótico. Além disso, análises de PCR convencional do cDNA obtido foram conduzidas com as duas linhagens para verificação da expressão de *APJ1*, utilizando *primers* da tabela 2.

## Expressão de *APJ1* em diferentes concentrações de etanol

A sequência do gene *APJ1* (número de acesso NP\_014322.1) foi recuperada do NCBI. Primer foi desenhado por meio do Primer3Plus<sup>29</sup> e a especificidade dos oligonucleotídeos foi avaliada por meio do programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>)<sup>30</sup>. As sequências dos *primers* para os genes endógenos *ACT1*<sup>31</sup> e *RBS1*<sup>32</sup> foram obtidas da literatura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	Primer F (5' - 3')	Primer R (5' - 3')
<i>ACT1</i>	TGGATTCCGGTGATGGTGTT	TCAAAATGGCGTGAGGTAGAGA
<i>APJ1</i>	CATGCAAAGGGCAAGGTATT	CGCAATCTGCACAAGTTTGA
<i>RBS1</i>	GGTGCGATTCCGAAACGTAGTG	CAGTATCCCTAGATGACGGCGAA

Pré-inóculos das linhagens BY4741 e Y02999 foram crescidos em meio YPD por 16 horas, em triplicata biológica. Posteriormente, inóculos das células foram preparados (D.O.<sub>600</sub> ~ 0,300) em frascos erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de meio YPD novo. Os inóculos foram mantidos a 30 °C sob agitação de 150 rpm (Incubadora TE-420, Tecnal). O estresse por etanol (ultrapuro, Sigma) foi induzido quando as células atingiram D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,0. Os frascos foram divididos em três grupos para cada linhagem: uma triplicata controle (sem etanol), uma triplicata com concentração intermediária de etanol (8% v/v) e uma triplicata com concentração elevada de etanol (12% v/v). Após a adição de etanol, os volumes dos frascos foram completados para 25 mL, com a adição de água ultrapura, e novamente incubados a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 2 horas (Incubadora TE-420, Tecnal).

A extração de RNA foi feita pelo método *Hot Phenol*, descrito por Collart e colaboradores, com adaptações<sup>33</sup>. Após o período de estresse, 3 mL de células foram coletadas por centrifugação (4000 x g, 5 minutos) em microtubos (1,5 mL) e lavadas com água ultrapura, sendo novamente coletadas por centrifugação. As células foram então ressuspensas em 500

$\mu\text{L}$  de tampão AE (50 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA, pH 5,2) e 50  $\mu\text{L}$  de SDS (10% m/v). Após, foi adicionado 550  $\mu\text{L}$  de fenol ácido (pH 3,0) aos tubos, seguido de incubação a 65 °C por 60 minutos, com agitação vigorosa (vórtex) a cada 10 minutos. Ao final desse período, as amostras foram incubadas a 4 °C (5 minutos) seguido de incubação a -20 °C (20 minutos). Os microtubos foram centrifugados (13000  $\times g$ , 5 minutos, 4 °C) e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos. Após, foi adicionado 1 V de fenol:clorofórmio (1:1), os tubos foram homogeneizados por inversão e novamente centrifugados (13000  $\times g$ , 5 minutos, 4 °C). A fase superior foi novamente recuperada e foi adicionado 1 V de clorofórmio aos tubos, seguido de homogeneização por inversão. Após 5 minutos, as amostras foram centrifugadas (13000  $\times g$ , 5 minutos, 4 °C) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com a adição de 0,1 V de acetato de sódio (3 M, pH 5,3) e 2,5 V de etanol absoluto gelado por 16 horas a -20 °C. Ao final, as amostras foram centrifugadas (13000  $\times g$ , 15 minutos, 4 °C), o sobrenadante descartado e os precipitados lavados com etanol 70% (v/v). Os tubos foram centrifugados (13000  $\times g$ , 5 minutos, 4 °C) e o RNA obtido ressuspenso em 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura DNase-free.

A extração foi avaliada em gel de agarose (1,5% m/v) corado com brometo de etídeo. As amostras foram tratadas com RNase-free DNase I (Promega) e quantificadas por espectrofluorometria utilizando Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), de acordo com manual do fabricante. O cDNA obtido foi submetido a PCR convencional (5 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C; 5 min a 72 °C) e o resultado foi avaliado em gel de agarose para confirmação da presença de *APJ1*.

A análise de qPCR foi feita usando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os ensaios foram conduzidos em duplicata técnica, utilizando as condições a seguir: 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C. A quantificação foi feita por meio de curva-padrão, através de equação da reta relacionando Ct médio e

$\log_{10}$  da concentração de cDNA (0,0032 – 50,0 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ ). Os resultados foram normalizados com os genes endógenos *ACT1* e *RBS1*. A análise estatística foi feita por meio do teste t não-pareado (GraphPad Prism 5).

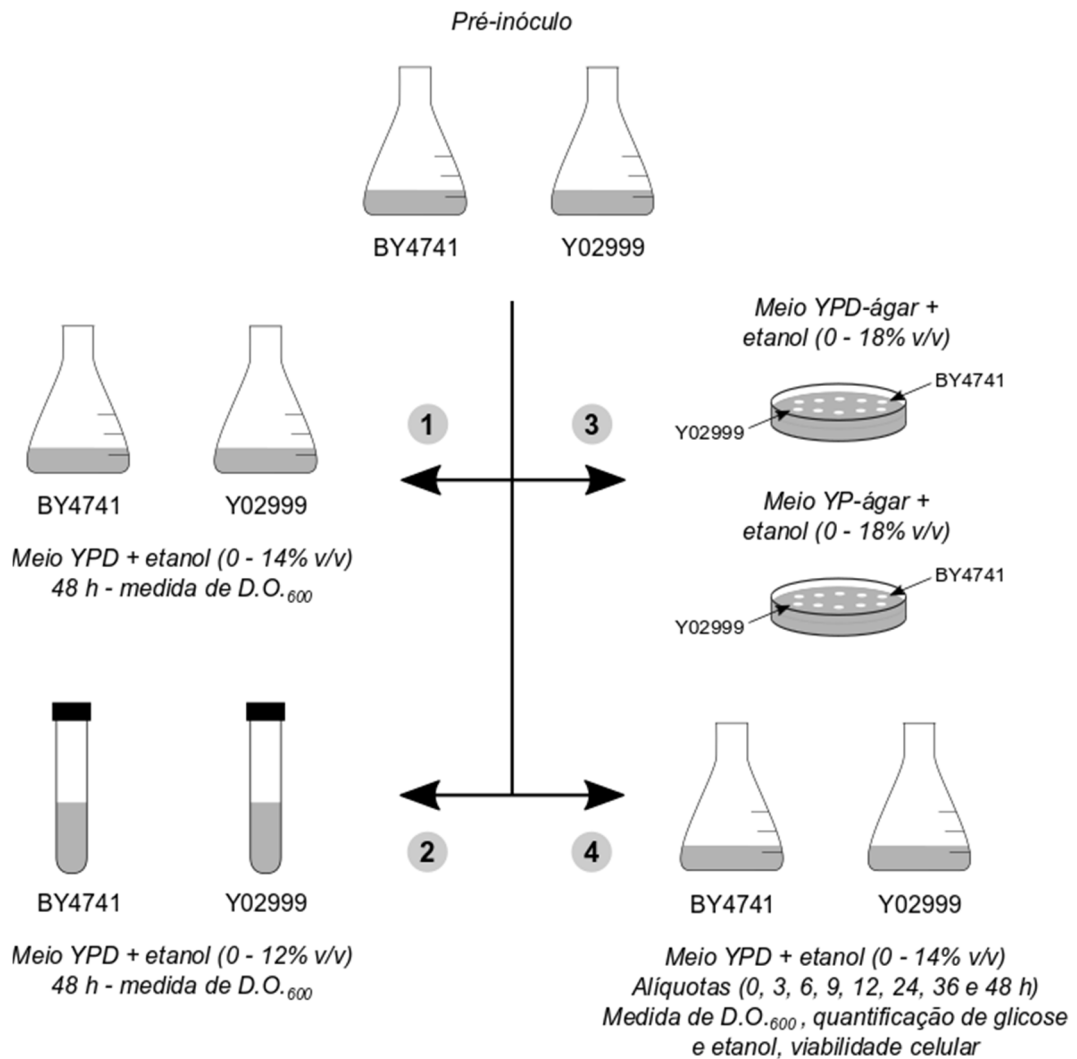
### **Avaliação da tolerância a etanol**

Inóculos de 25 mL (D.O.<sub>600</sub> ~ 0,500) de meio YPD contendo diferentes concentrações de etanol (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14% v/v) foram preparados em frascos erlenmeyer (125 mL) e incubados a 30 °C e 150 rpm (Incubadora TE-420, Tecnal) por 48 horas. Ao final desse período, a D.O.<sub>600</sub> foi mensurada. Ensaio similar foi realizado em tubos de ensaio com tampa de rosca (20 mL) contendo 5 mL de meio YPD suplementado com etanol (0 – 12% v/v, tubo de ensaio). As medidas de D.O.<sub>600</sub> foram normalizadas em relação a triplicata controle na ausência de etanol.

Ensaio de crescimento em meio sólido (YPD-ágar) contendo etanol (0, 4, 8, 12, 14, 16 e 18% v/v) foram feitos por plaqueamento em forma de gota (*spot*). Inóculos de 5 mL (D.O.<sub>600</sub> ~ 0,500) de meio YPD foram preparados e crescidos até D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,000 (30 °C, 150 rpm). Ao final, 5  $\mu\text{L}$  de diluições seriadas das amostras foram plaqueados e o crescimento monitorado por 96 horas. Além disso, ensaio similar foi feito em meio YP-ágar contendo etanol (0, 4, 8, 10 e 12 v/v) como única fonte de carbono, para reproduzir os experimentos da literatura<sup>27</sup>. As placas foram fotografadas e posteriormente tratadas com o software Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe©).

O monitoramento da capacidade fermentativa foi feito em 25 mL de meio YPD (D.O.<sub>600</sub> ~ 0,500) contendo diferentes concentrações etanol (0, 4, 8 e 12% v/v) sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas) para mensuração de D.O.<sub>600</sub>, quantificação de glicose e etanol. A análise de viabilidade foi feita em meio sólido (YPD-ágar) das alíquotas a partir de 12 horas, utilizando 5  $\mu\text{L}$  de diluições seriadas das alíquotas para plaqueamento em forma de gota (*spot*). Após 36 horas de crescimento,

spots que apresentavam colônias isoladas foram contados e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi estimado.



**Figura 3.** Ensaios fisiológicos para avaliação da tolerância ao etanol de linhagens de *S. cerevisiae*. A partir de pré-inóculo previamente preparado, inóculos em frascos erlenmeyer (1) e em tubos de ensaio com tampa de rosca (2) foram utilizados para avaliar a capacidade de crescimento dos organismos após 48 horas de incubação (30 °C, 150 rpm). Além disso, a capacidade de crescimento em meio sólido contendo etanol (3) foi avaliada por meio do plaqueamento de gotas (spots) de diferentes diluições do inóculo. Por fim, a capacidade fermentativa na presença de etanol (4) foi avaliada por meio da quantificação de alíquotas ao longo do tempo. Além disso, ensaios de viabilidade (plaqueamento em meio sólido) foram realizados para verificar o efeito da exposição celular ao etanol.

## **Efeito da temperatura, pH, concentração de glicose e de ácido acético sobre o crescimento de linhagens de *S. cerevisiae***

Inóculos de 25 mL ( $D.O_{600} \sim 0,500$ ) de meio YPD foram preparados em frascos erlenmeyer (125 mL) em diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6 e 7) e incubados em diferentes temperaturas (30, 33, 37 e 42 °C) sob agitação de 150 rpm (figura 4). As medidas de pH foram feitas usando pHmetro (AZ® 8650) e os valores ajustados com HCl (0,1 M) ou NaOH (0,1 M). Após 48 horas, a  $D.O_{600}$  foi mensurada e alíquotas das réplicas foram retiradas para quantificação de glicose e etanol.

Foi avaliado também o crescimento de *S. cerevisiae* na presença de ácido acético. Inóculos de 25 mL ( $D.O_{600} \sim 0,500$ ) de meio YPD foram preparados em frascos erlenmeyer (125 mL) contendo ácido acético (0, 25, 50 e 100 mM) e o pH foi ajustado (5,0) para avaliar o efeito inibitório apenas do composto. Após 12 horas (tempo de maior produtividade no ensaio controle), a  $D.O_{600}$  foi mensurada e alíquotas das réplicas foram retiradas para quantificação de glicose e etanol.

Para analisar o efeito da concentração de açúcar no crescimento e fermentação das linhagens, meio YP (pH 5,0) suplementado com glicose (2, 4, 8, 15 e 20% m/v) foi utilizado para o preparo de inóculos de 25 mL ( $D.O_{600} \sim 0,500$ ) em frascos erlenmeyer (125 mL). As amostras foram incubadas a 33 °C sob agitação de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo (0, 12, 24, 36 e 48 horas) para mensuração de  $D.O_{600}$ , quantificação de glicose e etanol.

## **Quantificação de metabólitos por HPLC e estimativa de parâmetros fermentativos**

As alíquotas coletadas para quantificação de metabólitos foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para tubos novos. As amostras foram então filtradas em membranas (0.22  $\mu$ m) e diluídas em água ultrapura estéril. A quantificação foi feita por HPLC (Shimadzu) equipado com um detector de índice de refração (SPD-20A) e coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad). A eluição foi feita com ácido sulfúrico 5 mM (fase móvel) sob fluxo de

0.7 mL.min<sup>-1</sup> a 45 °C. Curvas-padrão de glicose e etanol foram utilizadas para a estimativa da concentração de metabólitos nas amostras.

A produtividade volumétrica foi calculada pela razão entre a concentração de etanol produzido e o tempo decorrido (equação 1). O rendimento do processo estimado foi calculado a partir da quantidade de etanol produzido e quantidade de açúcar consumido (equação 2). Após, foi determinada a eficiência do processo em função rendimento teórico estimado (equação 3).

$$\text{Produtividade volumétrica (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{concentração de etanol (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{tempo (h)}}$$

**Equação 1.** Equação utilizada para a determinação da produtividade volumétrica.

$$\text{Rendimento real (g.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{etanol produzido (g)}}{\text{açúcar consumido (g)}}$$

**Equação 2.** Equação utilizada para a determinação do rendimento real dos processos fermentativos, estimado para o intervalo de tempo de maior produção de etanol.

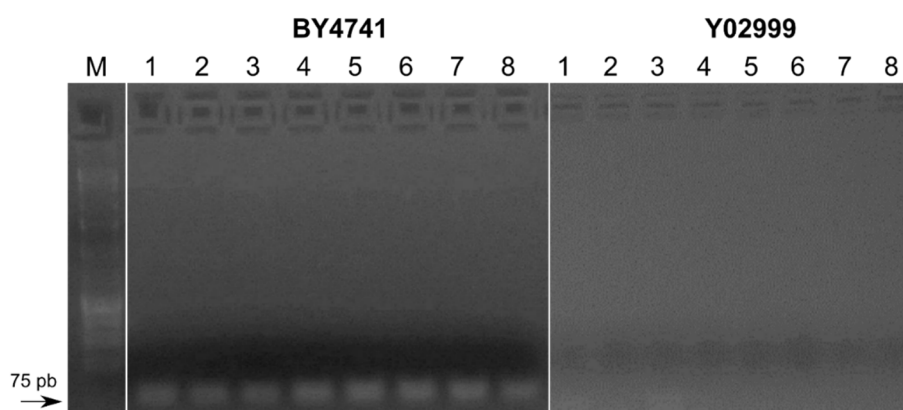
$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{rendimento real (g.g}^{-1}\text{)}}{0,51 \text{ g.g}^{-1}} \times 100\%$$

**Equação 3.** Equação utilizada para a determinação da eficiência fermentativa. O valor do rendimento teórico máximo (0,51 g.g<sup>-1</sup>) leva em consideração que cada molécula de glicose (180,16 g/mol) é capaz de produzir duas moléculas de etanol (46,07 g/mol).

## RESULTADOS

### Confirmação das linhagens em estudo

O crescimento em meio auxotrófico confirmou o genótipo das linhagens BY4741 e Y02999, sendo estas incapazes de crescerem em meios com ausência de histidina, leucina, metionina ou uracila. Quanto ao crescimento em antibiótico (Geneticina), BY4741 foi incapaz de crescer em meio sólido contendo concentrações de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ou superiores, enquanto Y02999 foi capaz de crescer em todas as concentrações testadas. Por fim, ensaios de PCR convencional utilizando cDNA indicaram a presença de *APJ1* em BY4741, mas não em Y02999. Análises de PCR convencional utilizando cDNA confirmaram a ausência de *APJ1* na linhagem Y02999, como esperado (figura 4). Apesar disso, a expressão desse gene em *S. cerevisiae* foi analisada em ambas as linhagens para validação.

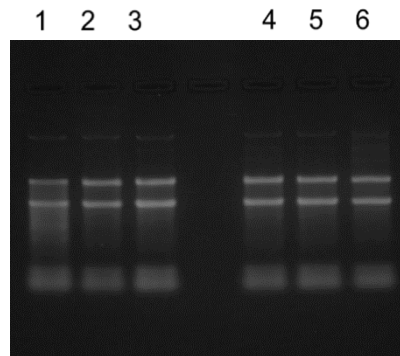


**Figura 4.** Gel de agarose (2,0% m/v) para visualização da amplificação de *APJ1* nas linhagens de *S.cerevisiae* BY4741 e Y02999. M, marcador 1 kb DNA ladder (Cellco); 1-3, células crescidas em meio YPD sem etanol; 4-6, células crescidas em meio YPD contendo 8% (v/v) de etanol; 7-8, células crescidas em meio YPD contendo 12% (v/v) de etanol.

### Expressão de *APJ1* em *S. cerevisiae* BY4741 submetida a estresse por etanol

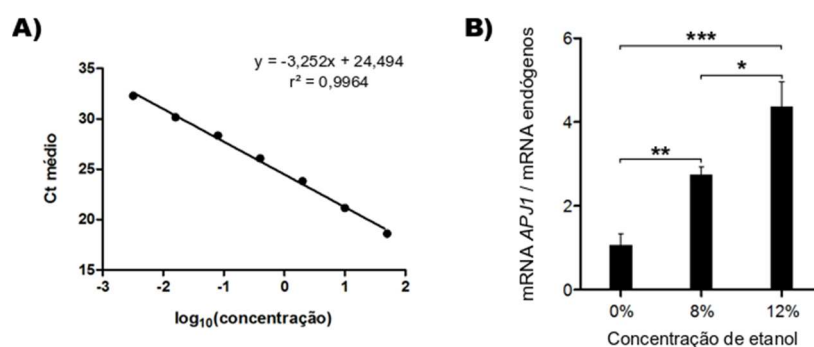
A extração de RNA (Figura 5) apresentou bons rendimentos e as adaptações se mostraram necessárias, principalmente para a extração nos tratamentos contendo etanol. Outros métodos apresentavam baixos

rendimentos e/ou RNA degradado, comprometendo a utilização do material para as etapas posteriores.



**Figura 5.** Avaliação da qualidade da extração de RNA pelo método descrito. 1-3, amostras de BY4741 extraídas em meio YPD contendo 0, 8 e 12% (v/v) de etanol, respectivamente; 4-6, amostras de Y02999 extraídas em meio YPD contendo 0, 8 e 12% (v/v) de etanol, respectivamente.

Após a obtenção do cDNA, diluições foram feitas e curvas-padrão com os primers dos genes *ACT1*, *RBS1* e *APJ1* (Figura 6A) foram construídas. A partir dessas curvas, foi feita a correlação com o Ct observado nos experimentos de estresse por etanol. Para Y02999, não foi possível quantificar a presença de *APJ1* em nenhum dos ensaios, confirmando sua deleção. Para BY4741, é possível ver que a expressão gênica aumenta em função do aumento da concentração de etanol (Figura 6B).

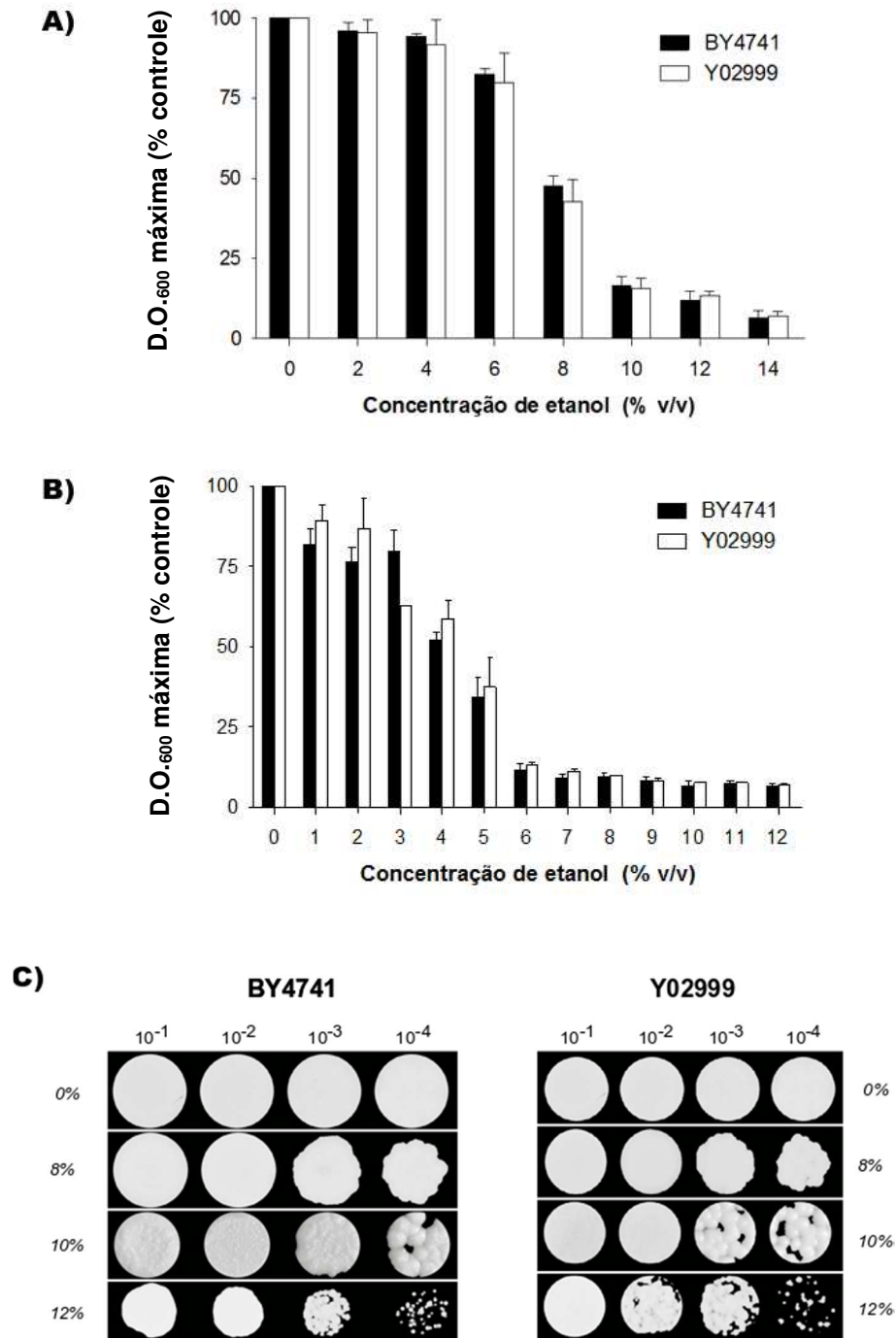


**Figura 6.** Análise da expressão do gene *APJ1* por qPCR em *S. cerevisiae* BY4741. A) Curva-padrão construída a partir de diluições do cDNA, utilizada para as estimativas da concentração de *APJ1*. B) Análise da expressão diferencial normalizada (genes endógenos *ACT1* e *RBS1*) na linhagem BY4741 crescida em meio contendo diferentes concentrações (v/v) de etanol, conforme indicado. As análises estatísticas foram conduzidas por teste-t não-pareado. (\*), p-valor < 0,05; (\*\*), p-valor < 0,01; (\*\*\*), p-valor < 0,001.

## **Ensaio de tolerância ao etanol não evidenciam diferenças fisiológicas causadas pela deleção de *APJ1***

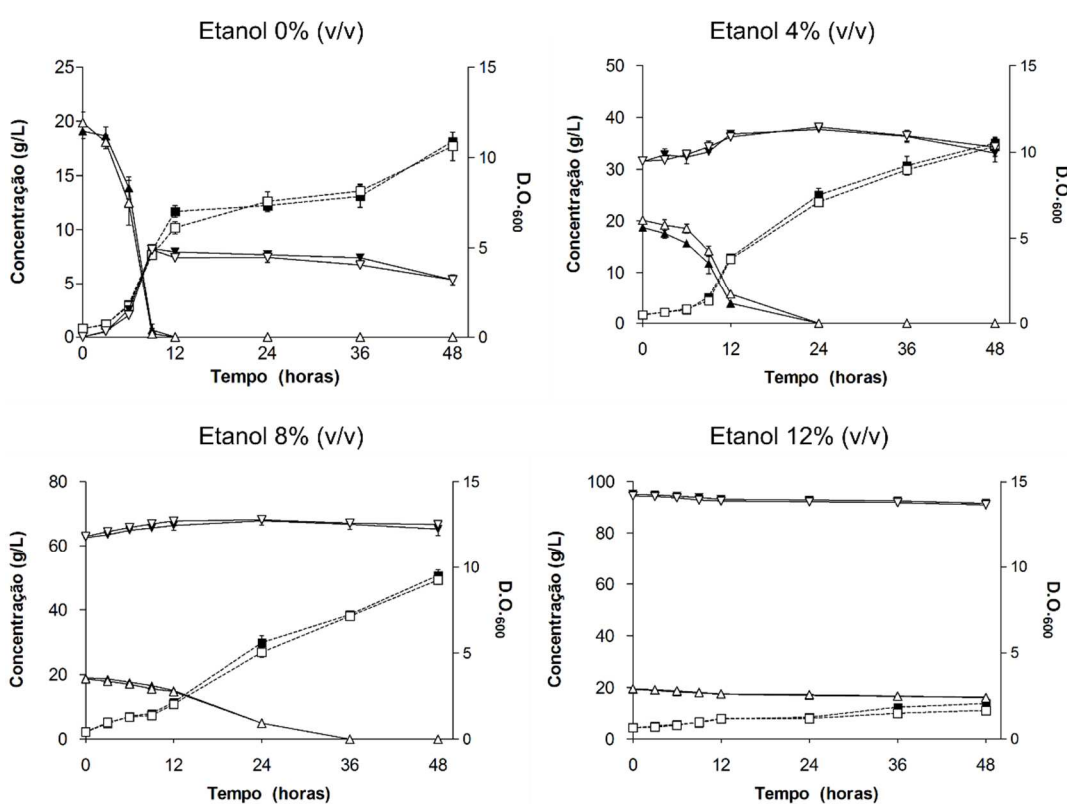
A análise do crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* na presença de etanol indicaram capacidade de crescimento similar nas diferentes condições. O crescimento relativo, em frascos erlenmeyer (Figura 7A), é pouco afetado na presença de até 6% (v/v) de etanol, apresentando uma queda de cerca de 50% quando a concentração de etanol é elevada para 8% (v/v). Em concentrações superiores de etanol, o crescimento celular fica severamente comprometido. Os ensaios em tubo (Figura 7B) indicam similaridades entre as linhagens. Entretanto, devido à baixa aeração do sistema, o crescimento celular fica comprometido mesmo em baixas concentrações de etanol. Nessas análises, a presença de 4% (v/v) de etanol é o suficiente para reduzir a capacidade de multiplicação celular em cerca de 50%, enquanto concentrações superiores a 5% (v/v) apresentam pouco ou nenhum crescimento.

A análise da tolerância ao etanol em meio sólido (Figura 7C) confirma as observações anteriores quanto ao crescimento das células. O registro fotográfico feito após 96 horas de crescimento indica que concentrações de até 8% (v/v) de etanol pouco afetam a proliferação celular. Entretanto, concentrações superiores afetavam ambas as linhagens, reduzindo principalmente a velocidade de crescimento, monitorada ao longo das horas. Na presença de 14% (v/v) de etanol (dados não apresentados), as leveduras apresentavam crescimento drasticamente reduzido, apresentando colônias isoladas e *spots* menores. Para concentrações superiores de etanol, nenhum crescimento foi observado para ambas as linhagens. Nos ensaios de tolerância em meio sólido contendo etanol como única fonte de carbono (dados não apresentados), ambas as linhagens cresceram apenas até a concentração de 8% de etanol (v/v), de forma mais lenta e em *spots* mais reduzidos. Nessa concentração, diluições maiores foram o suficiente para que não fosse observado formação de colônia.



**Figura 7.** Avaliação da tolerância ao etanol em linhagens de *S. cerevisiae* com a deleção (Y02999) ou não (BY4741) do gene *APJ1*. **A)** Crescimento relativo (normalizado com o ensaio controle) após 48 horas de incubação (30 °C, 150 rpm) em frascos erlenmeyer contendo meio YPD acrescido de etanol, conforme concentrações indicadas no gráfico. **B)** Crescimento relativo (normalizado com o ensaio controle) após 48 horas de incubação (30 °C, 150 rpm) em tubos de ensaio com tampa de rosca contendo meio YPD acrescido de etanol, conforme concentrações indicadas no gráfico. **C)** Crescimento em meio sólido (YPD-ágar acrescido de diferentes concentrações de etanol, indicado horizontalmente) de diferentes diluições (indicado verticalmente) de inóculos das linhagens.

Além dos ensaios de tolerância apresentados, foi avaliado o impacto do etanol na capacidade fermentativa das linhagens (Figura 8). Em 12%, nota-se o impacto do estresse causado por elevadas concentrações de etanol, uma vez que as células pouco crescem e são incapazes de consumir glicose. Nas demais concentrações, o que se observa é que a presença de etanol retarda tanto o crescimento celular quanto o consumo de glicose, mas ainda assim é possível observar essas atividades celulares. Junto a isso, o estresse também afeta a produtividade e eficiência do processo (Tabela 2), comprometendo não apenas a fermentação como também a viabilidade celular (Tabela 3).



**Figura 8.** Crescimento, consumo de glicose e produção de etanol em ensaios de fermentação em meio YPD contendo etanol (0, 4, 8 e 12% v/v). (■), D.O.<sub>600</sub> BY4741; (▲), concentração de glicose BY4741; (▼), concentração de etanol BY4741; (□), D.O.<sub>600</sub> Y02999; (△), concentração de glicose Y02999; (▽), concentração de etanol Y02999.

**Tabela 2.** Parâmetros médios de crescimento calculados para os ensaios de fermentação das linhagens BY4741 e Y02999 na presença de etanol (0, 4 e 8% v/v). Ensaio realizado em triplicata biológica. Análise estatística realizada por meio de ANOVA seguido de teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Médias identificadas com mesma letra não apresentam diferença estatística.

Tratamento	Tempo (h)	Glicose Consumida (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol Produzido (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Eficiência (%)
BY4741 0%	12	19,10 ± 0,67	8,26 ± 0,28	0,69 ± 0,02 <sup>a</sup>	84,84 ± 5,63 <sup>a</sup>
Y02999 0%	12	19,59 ± 0,99	8,16 ± 0,17	0,68 ± 0,01 <sup>a</sup>	81,66 ± 2,55 <sup>a</sup>
BY4741 4%	24	19,10 ± 0,63	6,24 ± 0,64	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	64,03 ± 5,37 <sup>b</sup>
Y02999 4%	24	19,88 ± 0,35	6,58 ± 0,78	0,27 ± 0,02 <sup>b</sup>	64,89 ± 5,79 <sup>b</sup>
BY4741 8%	36	19,03 ± 0,81	4,17 ± 1,47	0,12 ± 0,03 <sup>c</sup>	43,01 ± 8,78 <sup>c</sup>
Y02999 8%	36	18,68 ± 0,57	4,10 ± 0,46	0,11 ± 0,01 <sup>c</sup>	43,05 ± 5,22 <sup>c</sup>

**Tabela 3.** Viabilidade celular das linhagens em estudo nas concentrações de 4, 8 e 12% (v/v) de etanol nos ensaios de fermentação. Alíquotas foram coletadas após esses tempos, diluídas e plaqueadas em meio YPD-ágar para contagem de colônias e estimativa da viabilidade celular média. Ensaio realizado em triplicata biológica. Análise estatística realizada por meio de ANOVA seguido de teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Médias identificadas com mesma letra não apresentam diferença estatística.

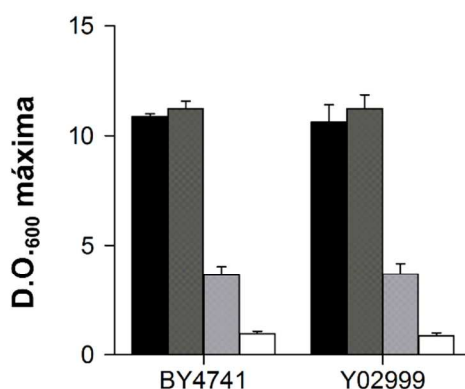
Tempo (h)	BY4741			Y02999		
	4%	8%	12%	4%	8%	12%
12	97,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	89,2 ± 5,5 <sup>a</sup>	71,7 ± 3,2 <sup>b</sup>	94,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	83,0 ± 6,8 <sup>a</sup>	62,6 ± 8,1 <sup>bc</sup>
24	86,0 ± 4,5 <sup>a</sup>	76,2 ± 4,9 <sup>b</sup>	55,2 ± 3,9 <sup>bc</sup>	88,0 ± 2,5 <sup>a</sup>	70,4 ± 7,4 <sup>b</sup>	56,3 ± 3,7 <sup>bc</sup>
36	83,9 ± 6,7 <sup>a</sup>	59,0 ± 4,2 <sup>bc</sup>	25,8 ± 2,5 <sup>e</sup>	86,3 ± 4,8 <sup>a</sup>	58,8 ± 7,2 <sup>c</sup>	28,3 ± 4,1 <sup>e</sup>
48	67,5 ± 5,3 <sup>bc</sup>	44,5 ± 7,2 <sup>d</sup>	16,5 ± 9,2 <sup>e</sup>	61,9 ± 3,9 <sup>c</sup>	39,4 ± 4,4 <sup>d</sup>	16,6 ± 6,7 <sup>e</sup>

### **Avaliação do efeito da temperatura, pH, concentração de glicose e ácido acético na fisiologia celular**

Além dos efeitos do etanol sobre a capacidade fermentativa das linhagens, foi avaliado também o impacto da presença de ácido acético –

importante inibidor celular, comumente produzido em processos de pré-tratamento ácido, durante a hidrólise da porção hemicelulósica para a produção de etanol 2G<sup>34</sup> (Figura 9). É interessante notar que pequenas concentrações de ácido acético (25 mM) são capazes de promover ligeiro aumento tanto na densidade populacional máxima quanto na eficiência da fermentação. Apesar disso, um pequeno aumento da concentração de ácido acético no meio (50 mM) é capaz de reduzir o crescimento celular e a eficiência do processo. Em concentrações mais elevadas (100 mM), o crescimento celular praticamente cessa e há pouca produção de etanol, inviabilizando o processo.

**A)**

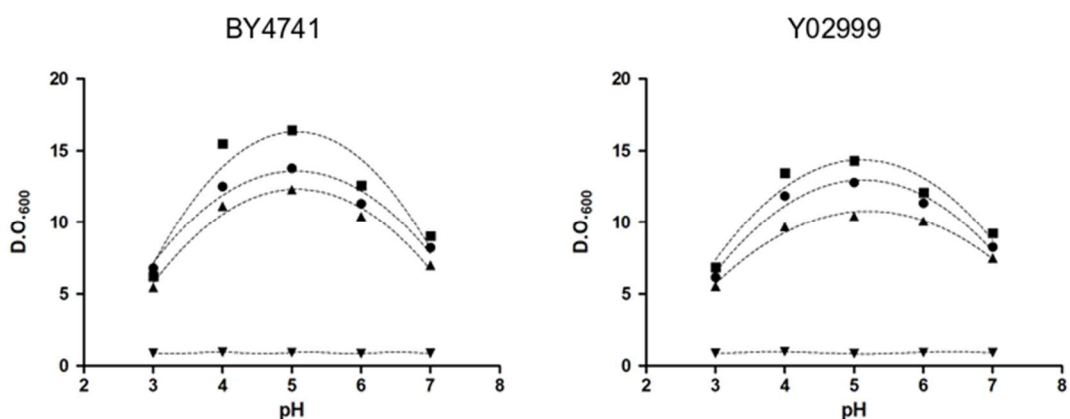


**B)**

Tratamento	Glicose consumida (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol produzido (g.L <sup>-1</sup> )	Eficiência (%)
BY4741 0 mM	19,10 ± 0,67	8,26 ± 0,30	84,84 ± 2,30 <sup>a</sup>
Y02999 0 mM	19,59 ± 0,99	8,16 ± 0,26	81,66 ± 3,46 <sup>a</sup>
BY4741 25 mM	19,68 ± 0,91	9,02 ± 0,22	89,82 ± 3,61 <sup>a</sup>
Y02999 25 mM	19,70 ± 0,47	8,90 ± 0,28	88,59 ± 4,27 <sup>a</sup>
BY4741 50 mM	8,42 ± 0,66	3,02 ± 0,13	70,41 ± 5,30 <sup>b</sup>
Y02999 50 mM	9,18 ± 1,34	3,17 ± 0,18	67,74 ± 7,82 <sup>b</sup>

**Figura 9.** Avaliação dos efeitos da presença de ácido acético no meio sobre a capacidade fermentativa das linhagens de *S. cerevisiae* BY4741 e Y02999. A) Crescimento absoluto máximo das linhagens de BY4741 na ausência (preto) e presença de 25 (cinza escuro), 50 (cinza claro) e 100 mM (branco) de ácido acético. B) Avaliação da capacidade fermentativa média das células tratadas com ácido acético após 12 horas de crescimento. Ensaio realizado em triplicata biológica. Análise estatística realizada por meio de ANOVA seguido de teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Médias identificadas com mesma letra não apresentam diferença estatística.

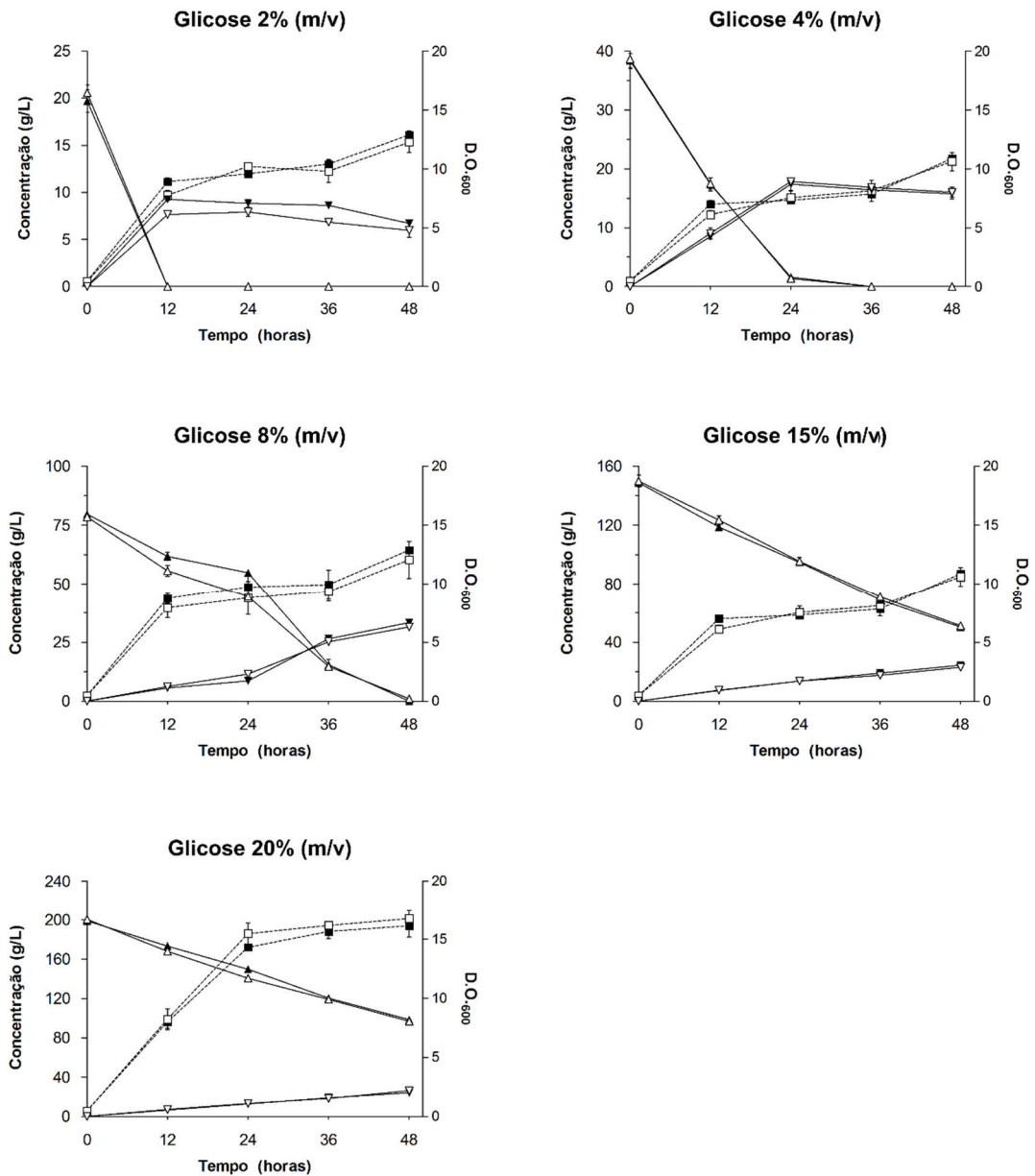
A análise fatorial de temperatura e pH indicou que ambas as linhagens crescem melhor a 33 °C em meios levemente ácidos, com pH ajustado para 5,0 (Figura 10). Como esperado, temperaturas acima de 40 °C inibem o crescimento celular. Após as definições de pH e temperatura, ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de açúcar foram conduzidos (Figura 11). Observa-se que a velocidade de consumo da glicose é pouco afetada nos diferentes tratamentos. Além disso, observa-se perfil similar de crescimento nas concentrações de 2 a 8% de glicose (m/v), com grande aumento na D.O.<sub>600</sub> nas horas iniciais, seguida de um retardo no crescimento. Para as concentrações de 15 e 20% (m/v), há uma extensão da fase de crescimento até 24 horas, seguida de estagnação. Em contrapartida, a eficiência da produção de etanol decresce com o aumento da concentração de glicose (Tabela 4), indicando que o excesso de açúcar compromete a capacidade fermentativa.



**Figura 10.** Avaliação dos efeitos de pH e temperatura no crescimento absoluto máximo das linhagens BY4741 e Y02999. As curvas estimam o comportamento médio da variação da temperatura em função do pH. (●), 30 °C; (■), 33 °C; (▲), 37 °C; (▼), 42 °C.

**Tabela 4.** Parâmetros médios calculados para os ensaios de fermentação das linhagens BY4741 (BY) e Y02999 (Y0) na presença de diferentes concentrações de açúcar (2, 4, 8, 15 e 20% m/v). Ensaio realizado em triplicata biológica. Análise estatística realizada por meio de ANOVA seguido de teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Médias identificadas com mesma letra não apresentam diferença estatística.

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose Consumida (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Etanol Produzido (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
BY 2%	12	20,38 ± 0,42	9,25 ± 0,33	0,77 ± 0,03 <sup>a</sup>	89,04 ± 4,03 <sup>a</sup>
Y0 2%	12	20,56 ± 0,83	8,65 ± 0,14	0,72 ± 0,02 <sup>a</sup>	82,52 ± 5,53 <sup>a</sup>
BY 4%	24	36,82 ± 1,13	17,41 ± 1,02	0,72 ± 0,04 <sup>a</sup>	92,70 ± 3,67 <sup>a</sup>
Y0 4%	24	37,31 ± 0,93	17,87 ± 0,48	0,74 ± 0,02 <sup>a</sup>	93,91 ± 2,74 <sup>a</sup>
BY 8%	48	79,75 ± 2,39	33,45 ± 1,52	0,69 ± 0,03 <sup>a</sup>	82,25 ± 3,64 <sup>b</sup>
Y0 8%	48	77,54 ± 2,24	31,58 ± 1,26	0,65 ± 0,02 <sup>a</sup>	79,86 ± 3,36 <sup>b</sup>
BY 15%	48	98,55 ± 2,41	24,48 ± 0,97	0,51 ± 0,02 <sup>b</sup>	48,71 ± 1,90 <sup>c</sup>
Y0 15%	48	98,74 ± 1,81	23,07 ± 0,52	0,49 ± 0,01 <sup>b</sup>	45,82 ± 3,21 <sup>c</sup>
BY 20%	48	100,46 ± 3,06	24,18 ± 0,75	0,50 ± 0,02 <sup>b</sup>	47,19 ± 4,13 <sup>c</sup>
Y0 20%	48	103,64 ± 2,33	26,17 ± 1,49	0,54 ± 0,03 <sup>b</sup>	49,52 ± 2,11 <sup>c</sup>



**Figura 11.** Gráficos de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol em ensaios de fermentação em meio YP (pH 5,0 e temperatura de 33 °C) suplementado com diferentes concentrações de glicose (2 – 20% m/v). (■), D.O.<sub>600</sub> BY4741; (▲), concentração de glicose BY4741; (▼), concentração de etanol BY4741; (□), D.O.<sub>600</sub> Y02999; (△), concentração de glicose Y02999; (▽), concentração de etanol Y02999.

## DISCUSSÃO

A partir dos estudos de Swinnen e colaboradores<sup>27</sup>, levantou-se a hipótese que a deleção de *APJ1* em linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae* (e possivelmente outras leveduras) poderia contribuir para o aumento da tolerância ao etanol, uma vez que não promoveria a degradação de proteínas sumoiladas. O estresse por etanol sabidamente aumenta a sumoilação global de proteínas diversas em *S. cerevisiae*<sup>35</sup>. Assim, proteínas potencialmente essenciais para a manutenção da homeostase celular não seriam degradadas, devido a ausência de *APJ1*, e a levedura seria capaz de sobreviver em concentrações mais elevadas de etanol. Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho apontam que o efeito fisiológico da deleção desse gene parece não afetar a capacidade fermentativa e de sobrevivência de *S. cerevisiae*.

O crescimento em meio sólido serve, de modo geral, apenas como um parâmetro comparativo entre linhagens, visto que é difícil precisar a concentração de etanol, uma vez que ele é adicionado ao meio em temperaturas próximas de 50 °C, podendo evaporar. Apesar disso, ao realizar o plaqueamento das linhagens na mesma placa, normaliza-se esse efeito da evaporação. Assim, não foi possível observar diferença fisiológica característica no crescimento das leveduras, como proposto anteriormente<sup>27</sup>. Mais que isso, o crescimento em meio líquido também parece ter sido pouco afetado entre as linhagens. Dados da literatura confirmam que o crescimento de *S. cerevisiae* é pouco afetado em concentrações de etanol inferior a 6% (v/v) e que valores superiores promovem impactos consideráveis sobre a multiplicação celular<sup>36-40</sup>.

Uma vez que a deleção de *APJ1* parece não ter afetado a tolerância ao etanol na linhagem de *S. cerevisiae* estudada, buscou-se avaliar o impacto de tal alteração genética em outras condições estressantes, como a presença de ácido acético ou elevadas concentrações de açúcar, bem como alterações de pH do meio e da temperatura de incubação. A combinação dos fatores temperatura e pH confirmou que o crescimento é maior em meios levemente ácidos (pH 5,0) e em temperaturas

intermediárias (33 °C) para ambas as linhagens, como comumente observado para *S. cerevisiae*<sup>41-44</sup>. Em concentrações mais elevadas (15 e 20% m/v) de glicose, o crescimento nas 24 horas iniciais é acentuado, seguido de um período de estagnação. Nas demais concentrações, o crescimento inicial não é tão vertiginoso – tal fato fica evidente na comparação do ensaio de 4% (m/v) com os de 15 e 20% (m/v). No primeiro, a D.O.<sub>600</sub> alcança valores próximos de 7,0 após o consumo de, aproximadamente, todo o açúcar (40 g.L<sup>-1</sup>); nos dois últimos, consumo equivalente de açúcar resulta em D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 15,0. Em contrapartida ao perfil de crescimento, concentrações menores de açúcar apresentaram maior eficiência fermentativa. Esses resultados são similares a observações da literatura<sup>40,44</sup> e sugerem que, sob elevado estresse osmótico, as células se multiplicam de forma mais acelerada, a fim de reduzir a concentração de açúcar e aumentar a sobrevivência celular, o que afeta a capacidade fermentativa e conseqüente rendimento do processo.

Na presença de ácido acético, foi constatado que a concentração de 25 mM promoveu um aumento do crescimento e da eficiência fermentativa de ambas as linhagens. Estudos anteriores já apontavam que concentrações menores de ácido acético poderiam aumentar a performance da fermentação de *S. cerevisiae*<sup>45,46</sup>. É possível que em concentrações menores, a presença de ácido acético contribua para o tamponamento do meio, minimizando sua acidificação<sup>47</sup>. Entretanto, a crescente presença desse inibidor no meio leva a maior acidificação do citosol, maior estresse oxidativo e menor atividade metabólica, comprometendo a eficiência da fermentação e a viabilidade celular<sup>48</sup>.

Ao avaliar os dados de qPCR de *APJ1*, confirmou-se na linhagem BY4741 que o aumento da concentração de etanol implicava em aumento da sua expressão gênica<sup>27,49</sup>. Na linhagem Y02999 não foi identificada a expressão do gene, como esperado. Swinnen e colaboradores verificaram que linhagens mais susceptíveis, como BY4741, apresentavam maior expressão de *APJ1* durante o estresse quando comparado a segregantes mais tolerantes<sup>27</sup>. Entretanto, a tolerância ao etanol não parece ter relação direta com a expressão de *APJ1*, como apresentado nos resultados de

crescimento tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Um trabalho de avaliação fenotípica e genotípica<sup>50</sup> identificou um segregante (MA-12) de linhagens industriais de *S. cerevisiae* que apresentava termo- e álcool-resistência, bem como maior rendimento de etanol que a linhagem PE-2, conhecida por sua alta eficiência<sup>51</sup>. Curiosamente, o segregante MA-12 apresentava expressão aumentada de *APJ1* sob estresse por etanol e por temperatura. Mais que isso, o aumento relativo da expressão desse gene era maior em MA-12 (cerca de 11 vezes) que em um outro segregante mais susceptível ao estresse (cerca de 3 vezes).

Análises de RNAseq do nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) mostraram que os efeitos de *APJ1* no transcriptoma de *S. cerevisiae* é pouco relacionado à resposta ao etanol. Dos 102 genes diferencialmente expressos entre as linhagens na presença de etanol, poucos apresentavam alguma correlação a adaptação fisiológica ao estresse. Além disso, entre os que apresentavam algum mecanismo conhecido de resposta ao etanol, foram identificados perfis pouco esclarecedores, como a down-regulação dos genes *OLE1*<sup>52,53</sup> e *HES1*<sup>38</sup> – identificados como responsivos ao estresse na síntese de lipídeos – concomitante a up-regulação de *HSP104*<sup>31,54</sup> – chaperona responsiva ao estresse na desagregação proteica – em Y02999.

Tentando compreender o papel fisiológico de Apj1p, Sahi e colaboradores<sup>17</sup> propuseram que essa proteína está envolvida na degradação de proteínas sumoiladas. A deleção apenas de *APJ1* pouco afetou o crescimento celular em 30 e 37 °C. Entretanto, a dupla deleção de *APJ1* e *SLX5* comprometeu criticamente o crescimento celular de *S. cerevisiae* a 37 °C. Tal fato sugere que a degradação de proteínas sumoiladas na presença de condições estressantes é um evento importante para a manutenção da homeostase celular e que Apj1p não é a única proteína envolvida no processo. Nossos resultados apontam que não existem efeitos evidentes da deleção de *APJ1* na tolerância a etanol e temperatura nas linhagens estudadas de *S. cerevisiae*, bem como na capacidade fermentativa em diferentes concentrações de açúcar.

Se o acúmulo de proteínas sumoiladas pode promover efeitos deletérios às leveduras em temperaturas ligeiramente elevadas<sup>17</sup>, o mesmo efeito poderia ser potencialmente observado na presença de etanol, uma vez que esse também leva à maior taxa de sumoilação de proteínas e consequente acúmulo<sup>35</sup>. Entretanto, a up-regulação de *APJ1* (em BY4741 sob estresse) ou a sua deleção não impacta significativamente a tolerância ao etanol ou à temperatura, indicando que não existe um mecanismo Apj1p-dependente para manutenção da homeostase de proteínas sumoiladas. Possivelmente isso ocorre devido à presença de baixas cópias proteicas na célula (pouco mais de 100) e à estrutura similar a outras chaperonas Hsp40<sup>18</sup>, como Ydj1p, que apresenta mais de 118 mil cópias<sup>16</sup> e talvez atue em funções similares. Assim, é possível que a ausência de Apj1p seja pouco impactante aos mecanismos de controle de degradação proteica, sendo sua função parcialmente compensada por outras proteínas em situações de estresse por etanol.

## CONCLUSÃO

As diferentes análises fisiológicas realizadas no presente trabalho não apontaram diferenças significativas entre as linhagens, tanto na avaliação do crescimento quanto na capacidade fermentativa. De modo geral, a deleção (Y02999) ou up-regulação (BY4741) de *APJ1* na presença de etanol parece não gerar efeitos fisiológicos diferentes em linhagens laboratoriais nas condições testadas. Assim, a compreensão dos efeitos da deleção desse gene demanda mais estudos, principalmente em linhagens industriais, para melhor compreensão do seu possível papel na tolerância ao etanol. Em contrapartida, a ausência de efeito significativo no crescimento em condições intermediárias de estresse, somado ao perfil de expressão não-reprodutivo em linhagens tolerantes e susceptíveis, apontam que *APJ1* não é um dos alvos principais a ser utilizado em estratégias de engenharia metabólica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kampinga, H. H., Craig, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(8):579-592.
2. Winkler, J., Tyedmers, J., Bukau, B., Mogk, A. Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. *J Struct Biol.* 2012;179(2):152-160.
3. Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(22):2560-2570.
4. Mayer, M. P., Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6):670-684.
5. Takayama, S., Xie, Z., Reed, J. C. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem.* 1999;274(2):781-786.
6. Lee, D. H., Sherman, M. Y., Goldberg, A. L. Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):4773-4781.
7. Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D., Lithgow, T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* 2004;5(6):567-571.
8. Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., Hartl, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):781-791.
9. Lian, H. Y. *et al.* Hsp40 interacts directly with the native state of the yeast prion protein Ure2 and inhibits formation of amyloid-like fibrils. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11931-11940.
10. Astor, M. T., Kamiya, E., Sporn, Z. A., Berger, S. E., Hines, J. K. Variant-specific and reciprocal Hsp40 functions in Hsp104-mediated prion elimination. *Mol Microbiol.* 2018.
11. Kirkland, P. A., Reidy, M., Masison, D. C. Functions of yeast Hsp40 chaperone Sis1p dispensable for prion propagation but important for prion curing and protection from prion toxicity. *Genetics.* 2011;188(3):565-577.
12. Kryndushkin, D. S., Smirnov, V. N., Ter-Avanesyan, M. D., Kushnirov, V. V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23702-23708.
13. Hines, J. K., Li, X., Du, Z., Higurashi, T., Li, L., Craig, E. A. [SWI], the prion formed by the chromatin remodeling factor Swi1, is highly sensitive to alterations in Hsp70 chaperone system activity. *PLoS Genet.* 2011;7(2):e1001309.

14. Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L., Muchowski, P. J. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science*. 2003;302(5651):1769-1772.
15. Jansen, A. H., Batenburg, K. L., Pecho-Vrieseling, E., Reits, E. A. Visualization of prion-like transfer in Huntington's disease models. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(3):793-800.
16. Ghaemmaghami, S. *et al*. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003;425(6959):737-741.
17. Sahi, C. *et al*. Sequential duplications of an ancient member of the DnaJ-family expanded the functional chaperone network in the eukaryotic cytosol. *Mol Biol Evol*. 2013;30(5):985-998.
18. Gillies, A. T., Taylor, R., Gestwicki, J. E. Synthetic lethal interactions in yeast reveal functional roles of J protein co-chaperones. *Mol Biosyst*. 2012;8(11):2901-2908.
19. Mullen, J. R., Brill, S. J. Activation of the Slx5-Slx8 ubiquitin ligase by poly-small ubiquitin-like modifier conjugates. *J Biol Chem*. 2008;283(29):19912-19921.
20. Bergink, S., Jentsch, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*. 2009;458(7237):461-467.
21. Johnson, E. S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:355-382.
22. Meulmeester, E., Melchior, F. Cell biology: SUMO. In: *Nature*. Vol 452. England2008:709-711.
23. Geiss-Friedlander, R., Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(12):947-956.
24. Hendriks, I. A., D'Souza, R. C., Yang, B., Verlaan-de-Vries, M., Mann, M., Vertegaal, A. C. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(10):927-936.
25. Enserink, J. M. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div*. 2015;10:4.
26. Zhou, Q., Liu, Z. L., Ning, K., Wang, A., Zeng, X., Xu, J. Genomic and transcriptome analyses reveal that MAPK- and phosphatidylinositol-signaling pathways mediate tolerance to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde for industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*. 2014;4:6556.
27. Swinnen, S. *et al*. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res*. 2012;22(5):975-984.
28. Thevelein, J., Moreno, M. R. F., Goovaerts, A., Swinnen, S., Inventors. Specific alleles important for ethanol tolerance. 2014-08-14, 2014.

29. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-74.
30. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
31. Ma, M., Liu, L. Z. Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* 2010;10:169.
32. Ismail, K. S., Sakamoto, T., Hasunuma, T., Kondo, A. Time-based comparative transcriptomics in engineered xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* identifies temperature-responsive genes during ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(9):1039-1050.
33. Collart, M. A., Oliviero, S. Preparation of yeast RNA. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;Chapter 13:Unit13.12.
34. Narendranath, N. V., Thomas, K. C., Ingledew, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2001;26(3):171-177.
35. Zhou, W., Ryan, J. J., Zhou, H. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32262-32268.
36. Abe, H. *et al.* Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase delta. *J Biosci Bioeng.* 2009;108(3):199-204.
37. Teixeira, M. C., Godinho, C. P., Cabrito, T. R., Mira, N. P., Sa-Correia, I. Increased expression of the yeast multidrug resistance ABC transporter Pdr18 leads to increased ethanol tolerance and ethanol production in high gravity alcoholic fermentation. *Microb Cell Fact.* 2012;11:98.
38. Qiu, Z., Jiang, R. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10.
39. Zhang, Y. *et al.* Co-benefits of global and regional greenhouse gas mitigation on U.S. air quality in 2050. *Atmos Chem Phys.* 2016;16(15):9533-9548.
40. Zhang, Q., Wu, D., Lin, Y., Wang, X., Kong, H., Tanaka, S. Substrate and Product Inhibition on Yeast Performance in Ethanol Fermentation. *Energy Fuels* 2015; 29(2):1019-1027.
41. Salvado, Z., Arroyo-Lopez, F. N., Guillamon, J. M., Salazar, G., Querol, A., Barrio, E. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(7):2292-2302.

42. Arroyo-Lopez, F. N., Orlic, S., Querol, A., Barrio, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int J Food Microbiol.* 2009;131(2-3):120-127.
43. Liu, X. *et al.* Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Sci.* 2015;80(4):M800-808.
44. Laluce, C., Tognolli, J. O., de Oliveira, K. F., Souza, C. S., Morais, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;83(4):627-637.
45. Yang, X., Wang, K., Zhang, J., Tang, L., Mao, Z. Effect of acetic acid in recycling water on ethanol production for cassava in an integrated ethanol-methane fermentation process. *Water Sci Technol.* 2016;74(10):2392-2398.
46. Greetham, D. Presence of Low Concentrations of Acetic Acid Improves Fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques.* 2014;5(1):1.
47. Thomas, K. C., Hynes, S. H., Ingledew, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(4):1616-1623.
48. Palma, M., Guerreiro, J. F., Sa-Correia, I. Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological Genomics Perspective. *Front Microbiol.* 2018;9:274.
49. Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2001;498(1):98-103.
50. Ibelli, F. Avaliação fenotípica e genotípica de segregantes de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* [Tese de doutorado]: Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2014.
51. Jansen, M. L. A. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res.* 2017;17(5).
52. Wang, Y., Zhang, S., Liu, H., Zhang, L., Yi, C., Li, H. Changes and roles of membrane compositions in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. *J Basic Microbiol.* 2015;55(12):1417-1426.
53. Dong, S. J., Yi, C. F., Li, H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;69:196-203.
54. Grably, M. R., Stanhill, A., Tell, O., Engelberg, D. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast *HSP104* gene. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):21-35.

## CAPÍTULO III

# **DIFERENÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DE LEVEDURAS: UM FATOR-CHAVE PARA COMPREENSÃO DA BAIXA TOLERÂNCIA AO ETANOL EM *Spathaspora passalidarum***

## **Diferenças nas sequências de fatores de transcrição de leveduras: um fator-chave para compreensão da baixa tolerância ao etanol em *Spathaspora passalidarum***

### **RESUMO**

A fermentação de pentoses, principalmente xilose, é uma etapa essencial para a otimização da produção de etanol 2G. A levedura *Spathaspora passalidarum* é um organismo promissor, pois fermenta xilose e outros açúcares eficientemente, em diferentes condições de aeração. Entretanto, sua baixa tolerância ao etanol é um fator limitante para sua utilização em processos fermentativos. No presente estudo, um inventário de fatores de transcrição de *S. passalidarum* contendo 149 proteínas distribuídas em 29 famílias foi predito e comparado com os genes de *Saccharomyces cerevisiae*. Embora a maioria das proteínas de resposta a estresses avaliadas sejam conservados entre as duas espécies, mais de 70% dos fatores de transcrição de *S. passalidarum* apresentam identidades inferiores a 30%, bem como ausência ou divergência de domínios funcionais. Análise comparativa de sequência proteica com outras treze leveduras também evidenciou ampla conservação evolutiva de proteínas efetoras da resposta, tais como Sod1p, Hsp104p e Tps1p, e baixa conservação entre os fatores de transcrição. Análises de expressão gênica na presença de estresse por etanol indicaram que a expressão de genes essenciais a tolerância, incluindo o fator de transcrição *MSN2/4*, é down-regulada em *S. passalidarum*, diferente do que é comumente observado em *S. cerevisiae*. Juntos, os resultados obtidos sugerem que a baixa tolerância ao etanol em *S. passalidarum* está, em parte, associada ao repertório de fatores de transcrição e ao controle da expressão de genes de resposta ao estresse.

**Palavras-chave:** *Spathaspora passalidarum*; Fermentação de xilose; Leveduras não-*Saccharomyces*.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, intensificou-se a busca por combustíveis alternativos ao petróleo, a fim de identificar fontes renováveis de energia e minimizar os impactos ambientais observados pela emissão de gases do efeito estufa<sup>1</sup>. Nesse cenário, o bioetanol produzido a partir de biomassa vegetal se apresenta como uma alternativa promissora. Após etapas de pré-tratamento e sacarificação<sup>2,3</sup> desta biomassa, os polímeros de celulose e hemicelulose são hidrolisados em açúcares fermentescíveis<sup>4</sup>. Nos processos fermentativos, a conversão de glicose em etanol é um processo bem consolidado e amplamente estudado, sendo *Saccharomyces cerevisiae* o principal organismo fermentador<sup>5</sup>. Entretanto, pentoses – tais como xilose – podem constituir até 20% de toda a biomassa lignocelulósica<sup>6</sup> e *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar tais açúcares naturalmente<sup>7,8</sup>.

Uma estratégia alternativa que vem ganhando atenção é a utilização direta das leveduras fermentadoras de pentose em processos industriais. Leveduras como *Spathaspora arborariae*<sup>9</sup>, *Scheffersomyces stipitis*<sup>10</sup>, *Scheffersomyces shehatae*<sup>10</sup> e *Candida jeffriesii*<sup>11</sup> foram identificadas como promissores organismos para fermentação de pentoses. Entre essas, *Spathaspora passalidarum*, uma levedura encontrada em intestino de besouros que consomem madeira, tem se destacado pela capacidade de fermentar eficientemente xilose e outros açúcares em diferentes condições de aeração<sup>12-14</sup>. No entanto, o pouco conhecimento sobre a genética e fisiologia desses organismos dificultam a otimização e escalonamento do uso destas leveduras em ambiente industrial. Além disso, pouco se sabe sobre sua tolerância a etanol e outros tipos de estresse. Dados prévios (submetidos para publicação) sugerem que tal levedura tem capacidade de crescimento e fermentação limitados mesmo em concentrações medianas de etanol (4 – 6% v/v).

Em resposta ao estresse por etanol, diferentes estudos têm relacionado os mecanismos de regulação transcricional aos estímulos ambientais<sup>15-18</sup>. Na presença de etanol, *S. cerevisiae* induz a expressão de genes como *PMA1* e *PMA2*, heat shock proteins, *TPS1* e *TPS2*, e *SOD1* e

*SOD2*, todos envolvidos em mecanismos de manutenção da homeostase celular<sup>19</sup>. Fatores de transcrição, tais como Msn2p e Msn4p, estão envolvidos em diferentes respostas a estresse, incluindo etanol, enquanto outros mais especializados, como Yap1p and Hsf1p, também são importantes para adaptação fisiológica ao etanol devido aos amplos danos causados por esse estresse<sup>20,21</sup>. É curioso notar que grande parte dos genes up-regulados sob estresse por etanol possuem em sua região promotora cis-elementos de ligação aos fatores de transcrição Hsf1p, Msn2p, Msn4p e Yap1p, corroborando a importância desses como mediadores da resposta<sup>20</sup>. Estudos com linhagens mutantes de *S. cerevisiae* indicam a importância dos fatores de transcrição na resposta a diversos estresses. A dupla deleção de *MSN2* e *MSN4* torna *S. cerevisiae* hipersensível ao etanol, afetando capacidade de crescimento e fermentação<sup>22</sup>. Por outro lado, a superexpressão de *MSN2* produz fenótipos mais tolerantes a diferentes estresses<sup>22,23</sup>. Além disso, a mutação pontual de resíduos de serina por alanina em Msn2/4p é o suficiente para alterar parâmetros fermentativos e tolerância ao etanol de *S. cerevisiae*, uma vez que a fosforilação pode alterar a translocação nuclear desse fator<sup>24</sup>.

Alterações em outros fatores de transcrição podem modificar respostas fisiológicas sob determinadas condições. A deleção de *YAP1* ou *STB5* compromete severamente o crescimento celular na presença de diferentes inibidores, como furfural, hidroximetilfurfural e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>25,26</sup>. A deleção de *HSF1* é letal mesmo em temperaturas intermediárias e a hiperfosforilação do fator de transcrição implica em fenótipo with a defective ethanol stress response<sup>27,28</sup>. A mutação randômica de *RPB7*, subunidade da RNA polimerase II, aumentou a produção e tolerância ao etanol por meio da alteração da expressão de mais de 300 genes<sup>29</sup>.

O genoma de *S. passalidarum* foi sequenciado em 2011 e depositado no NCBI<sup>30</sup>. Entretanto, diversas sequências estão anotadas como hipotéticas e quase nenhum fator de transcrição está identificado. Como a maior parte dos estudos focam na análise do metabolismo de xilose por essa levedura<sup>12,14,31</sup>, pouco se sabe sobre seus mecanismos moleculares de regulação transcricional durante o estresse por etanol. Neste

trabalho, um inventário de fatores de transcrição de *S. passalidarum* foram preditos através de abordagens de genômica comparativa e filogenética, e comparados com *S. cerevisiae*. Também foram identificados componentes de vias de sinalização e proteínas de resposta a diferentes estresses. Além disso, a regulação da expressão de alvos importantes para manutenção e aquisição de tolerância ao etanol em *S. passalidarum* foram analisados. Esse estudo é o primeiro a identificar potenciais fatores de transcrição de *S. passalidarum*, avaliando as diferenças estruturais com ortólogos de *S. cerevisiae* e o impacto na regulação da expressão de genes de resposta ao etanol.

## METODOLOGIA

### Produção de etanol e tolerância

As linhagens *S. cerevisiae* BY4741 e *S. passalidarum* NRRLY 27907 foram utilizadas para os estudos fisiológicos. Os ensaios de crescimento foram realizados em meio YPD (extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona e glicose 20 g.L<sup>-1</sup>) para *S. cerevisiae* e YPX (extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona e xilose 20 g.L<sup>-1</sup>) para *S. passalidarum*. Crescimento celular foi medido por meio da densidade óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) usando espectrofotômetro (Biospectro SP-220).

Pré-inóculos das leveduras foram crescidos a 30 °C (*S. cerevisiae*) e 32 °C (*S. passalidarum*) sob agitação de 150 rpm por 16 horas. Posteriormente, as células foram inoculadas (D.O.<sub>600</sub> inicial de 0,5) em frascos erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL meio de cultura novo. Diferentes concentrações de etanol (0, 2, 4, 6 e 8% v/v) foram adicionadas aos frascos e estes foram crescidos durante 48 horas e a D.O.<sub>600</sub> foi medida após o período de incubação. Ensaios de *spotting* foram utilizados para avaliar a tolerância ao etanol em meio sólido: as células das diferentes linhagens foram crescidas até a fase exponencial e diluídas para D.O.<sub>600</sub> de 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-3</sup>. Ao final, 5 µL de cada diluição foram plaqueados em YPD-ágar ou YPX-ágar com etanol e incubadas a 30 °C por 72 h. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica.

Células de *S. passalidarum* foram inoculadas em frascos erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio YPX + etanol (0, 4 e 6% v/v) e incubadas a 32 °C e 150 rpm. A D.O.<sub>600</sub> inicial foi ajustada para 1,0 e alíquotas foram retiradas após 12, 24, 48 and 72 h para avaliação da viabilidade celular e quantificação de xilose and etanol. O ensaio de viabilidade celular foi feito em meio sólido (YPX-ágar) por meio de ensaios de *spotting* em diferentes diluições. Após 36 h de crescimento em estufa, *spots* que continham colônias isoladas foram contados e o número de células viáveis foi estimado. A média da triplicata biológica foi calculada e

utilizada para análise estatística através de ANOVA seguido de teste Tukey (GraphPad Prism 5).

A quantificação de xilose e etanol foi feita por HPLC equipado com detector de índice de refração (SPD-20A) e coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad). As alíquotas foram previamente filtradas (filtro de membrana 0.22 µm) e a quantificação dos metabólitos foi feita a partir de curvas-padrão de xilose e etanol. A eluição das amostras foi feita com ácido sulfúrico 5 mM (fase móvel) sob fluxo de 0.7 mL/min a 45 °C.

### **Obtenção das sequências e OrthoMCL analysis**

As sequências de proteínas e nucleotídeos de *S. cerevisiae* S288C<sup>32</sup> foram obtidas do Saccharomyces Genome Database<sup>33</sup> (SGD, <https://www.yeastgenome.org/>), e as sequências de *S. passalidarum* NRRL Y-27907<sup>30</sup> do NCBI Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

A análise de proteínas ortólogas foi rodada localmente por meio do programa OrthoMCL<sup>34</sup> com índice de inflação padrão de 1.5, utilizando filtro para remoção de sequências de baixa qualidade – incluindo presença de *stop códons* internos e tamanho menor que 10 aminoácidos<sup>35</sup>. O programa utilizou o algoritmo BLASTp (v 2.2.21)<sup>36</sup> para realizar o alinhamento *all versus all sequences*. As sequências exclusivas de *S. cerevisiae* foram obtidas manualmente através da identificação de *OrthoMCL clusters* com ausência de proteínas de *S. passalidarum*. As análises de ontologia gênica (GO, *gene ontology*) das proteínas identificadas foram realizadas por meio do SGD Gene Ontology Slim Mapper com *p-value cutoff* igual a 0.01 (<https://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>) e apresentadas de acordo com processos biológicos e funções moleculares.

### **Análise filogenética e identificação de ortólogos putativos**

Os fatores de transcrição de *S. cerevisiae* foram selecionados a partir dos repositórios *The Yeast Transcription Factor Specificity Compendium* (<http://yetfasco.cabr.utoronto.ca/index.php>) e Yeabstract

(<http://www.yeasttract.com/>)<sup>37</sup>. A lista foi manualmente curada, de acordo com a sobreposição dos bancos de dados e dados da literatura (Arquivo suplementar S1). As sequências de 171 fatores de transcrição foram recuperadas e utilizadas para buscas de tBLASTn (v 2.2.21)<sup>36</sup> contra *Spathaspora passalidarum*. As sequências de proteínas e nucleotídeos dos resultados com E-value menor que 1E-05 foram manualmente curadas e anotadas.

As análises filogenéticas foram conduzidas dentro de cada família que continha mais de cinco proteínas e/ou para os resultados do tBLASTn inconclusivos. O software MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>)<sup>38</sup> foi utilizado para construção e visualização das árvores filogenéticas. Os fatores de transcrição de *S. cerevisiae* e as sequências identificadas de *S. passalidarum* foram agrupadas de acordo com o domínio de ligação ao DNA<sup>39</sup>, identificado pelo Pfam Database com *E-value cutoff* igual a 1.0 (<https://pfam.xfam.org/>)<sup>40</sup>. Alinhamento foi realizado com o algoritmo Muscle (configurações padrão) e as árvores filogenéticas foram construídas usando o método de Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*), com *JTT model* e *partial deletion of gaps/missing data treatment* (site coverage cutoff of 90%). Os testes de bootstrap foram realizados com 1000 replicatas<sup>41,42</sup> e nós com valores de suporte superiores a 50 foram considerados significativos e utilizados como referência para determinação de ortólogos putativos, junto a análise de domínios identificados<sup>43</sup>.

### **Identificação de domínios e características estruturais**

Os domínios proteicos conservados dos fatores de transcrição foram preditos por meio das ferramentas Pfam Database (*E-value cutoff igual a 1.0*) e Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/, default settings>)<sup>44</sup> e a localização do domínio de ligação ao DNA foi determinada como N-terminal, C-terminal ou Central. A estrutura primária das proteínas foi esquematizada com Illustrator for Biological Sequences (<http://ibs.biocuckoo.org/>) e editadas com Inkscape (<https://inkscape.org>). O tamanho e o ponto isoelétrico (pI) foram preditos por meio da ferramenta ProtParam (ExPASy,

<https://www.expasy.org/tools/>) e a identidade global de alinhamentos pareados entre os ortólogos foi estimada por meio do Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)<sup>45,46</sup> com configurações padrão.

### **Localização dos genes nos cromossomos e análise de sintonia**

As sequências de nucleotídeos de todos os fatores de transcrição putativos de *S. passalidarum* foram utilizadas para análise de BLASTn (v 2.2.21)<sup>36</sup> contra o genoma de *S. passalidarum* para determinar suas localizações (posição em cada *scaffold*). O software Circos (versão 0.69, <http://circos.ca/software/download/circos/>)<sup>47</sup> foi utilizado para mapeamento dos genes de *S. passalidarum* bem como para construção do mapa de sintonia em relação ao genoma de *S. cerevisiae*<sup>48</sup>.

### **Reconstrução das vias de sinalização e identificação dos genes de resposta**

As vias de sinalização de resposta a diferentes tipos de estresse (e.g., etanol, oxidativo e térmico) foram reconstruídas de acordo com dados da literatura. As sequências proteicas dos componentes de diferentes vias de *S. cerevisiae* (HOG<sup>19,49,50</sup>, MAPK<sup>21,49</sup>, MSN2/4<sup>19,21,51</sup>, HSF1<sup>51-53</sup>, SKN7<sup>54-56</sup>, YAP1<sup>57-59</sup> e resposta a estresse de parede celular<sup>49</sup>) foram recuperadas e a identificação de ortólogos putativos foi realizada por meio de análises tBLASTn contra *S. passalidarum*. Os resultados foram manualmente curados e os parâmetros tamanho e pI, domínios identificados e identidade global foram anotados e comparados. Análise similar foi feita com 300 genes de resposta a etanol e outros estresses em *S. cerevisiae*<sup>21,60-62</sup>, para avaliação da conservação dos elementos de resposta das vias de sinalização. Os valores de cobertura, identidade global e E-value foram anotados.

Para avaliar a conservação de importantes componentes da resposta ao estresse por etanol<sup>15,21,63</sup>, a sequência integral de três fatores de transcrição importantes ao processo (Hsf1p, Msn2/4p and Yap1p) e quatorze proteínas (Adh1p, Arg3p, Gnd2p, Hog1p, Hsp104p, Hsp30p, Ole1p, Pma1p, Pro1p, Sod1p, Sod2p, Tdh1p, Tps1p and Zwf1p) de *S. cerevisiae*, *S.*

*passalidarum* e outras leveduras foram utilizadas para construção de matrizes de identidade por meio do Clustal Omega. As matrizes obtidas foram coloridas de acordo com as identidades estimadas.

Para identificar cis-elementos putativos da região promotora dos respectivos genes, as sequências de nucleotídeos de *S. cerevisiae* foram utilizadas para análises de BLASTn contra o genoma de *S. passalidarum* para identificação das suas localizações. Após, a região de 1000 nucleotídeos adjacentes aos sítios de início de transcrição (códon ATG) foram recuperadas em *S. passalidarum* e as regiões promotoras dos genes de *S. cerevisiae* foram obtidas do Yeasttract. As sequências dos promotores foram utilizadas para predição de regiões de ligação a Msn2/4p, Yap1p e Hsf1p por meio do Yeasttract.

### **Extração de RNA e análise de quantitative real-time PCR (qPCR)**

Doze genes de *S. cerevisiae*, envolvidos em diferentes processos celulares de tolerância a etanol (*ADH1*, *ADH7*, *ARG3*, *GND2*, *HSP30*, *HSP104*, *MSN2/4*, *OLE1*, *SOD1*, *TDH1*, *TPS1* e *ZWF1*), foram selecionados. As sequências proteicas e nucleotídicas dos ortólogos em *S. passalidarum*, foram recuperadas. Os genes *ACT1* e *RBN18* foram selecionados como controles endógenos<sup>64</sup>. *Primers* foram desenhados com o software Primer3Plus<sup>65</sup> (Arquivo suplementar S2) e a especificidade dos oligonucleotídeos foi avaliada por meio do programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>)<sup>66</sup>.

Células de *S. passalidarum* foram pré-inoculadas em meio YPX por 16 horas. Inóculos de 20 mL foram preparados (D.O.<sub>600</sub> inicial ~ 0,20) em frascos erlenmeyer (125 mL) e incubados a 32 °C sob agitação de 150 rpm. Ao atingir D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,0 foi adicionado 1 mL de etanol e 4 mL de água ultrapura (etanol 4% v/v) ou 5 mL de água ultrapura (controle). Os frascos foram novamente incubados por 2 horas e as análises foram conduzidas em triplicatas biológicas.

As amostras foram submetidas a extração de RNA total utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram tratadas com RNase-free DNase I (Promega) e quantificadas por espectrofluorometria utilizando Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com manual do fabricante.

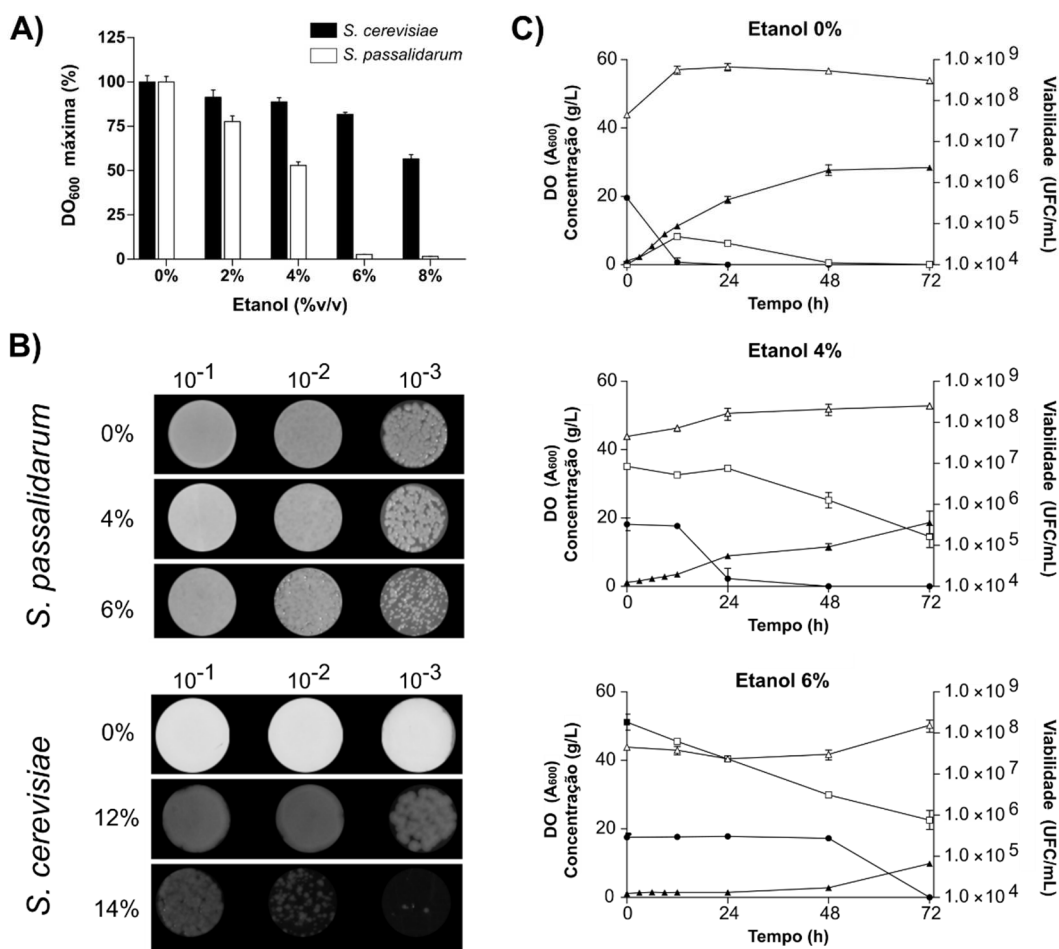
As análises de qPCR foram realizadas usando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no aparelho Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os ensaios foram conduzidos em duplicata técnica, utilizando as condições a seguir: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. A quantificação relativa foi feita por meio de curva-padrão obtida para cada gene, através de equação da reta relacionando Ct médio e  $\log_{10}$  da concentração de cDNA controle (0,39 – 50,0 ng.μL<sup>-1</sup>). Os resultados foram normalizados com os genes *ACT1* e *RBN18*. As análises estatísticas foram feitas por meio de teste-t bicaudal não-pareado (GraphPad Prism 5).

## RESULTADOS

### ***S. passalidarum* possui baixa tolerância ao etanol quando comparada com *S. cerevisiae***

Os ensaios de tolerância a etanol, realizados em meio líquido e sólido, indicaram clara diferença fisiológica entre *S. cerevisiae* e *S. passalidarum* (Figura 1A e 1B). Enquanto *S. passalidarum* não apresenta crescimento em concentrações de etanol superiores a 6% (v/v) em meio sólido, é possível observar crescimento em concentrações superiores a 10% (v/v) em *S. cerevisiae*. Nos ensaios de tolerância em meio sólido contendo 8% de etanol (v/v), não houve crescimento de *S. passalidarum* nas diferentes diluições testadas (dados não apresentados). De forma similar, a capacidade de crescimento de *S. passalidarum* em meio líquido é severamente limitada pela presença do etanol. O crescimento relativo decresce 50% na presença de 4% de etanol (v/v) e é praticamente nulo em 6% de etanol (v/v), enquanto *S. cerevisiae* apresenta crescimento relativo superior a 50% mesmo na presença de 8% de etanol (v/v).

Na presença de etanol no início da fermentação, *S. passalidarum* não foi capaz de fermentar, embora tenha sido capaz de crescer e consumir xilose (Figura 1C). Quando submetida ao estresse mais elevado, a célula manteve-se praticamente inerte durante as 48 h iniciais. Nesse período, observou-se constante diminuição das concentrações de etanol. Ao atingir concentração de aproximadamente 31 g.L<sup>-1</sup> de etanol (~ 4% v/v), a levedura começou a crescer e consumir xilose, confirmando que concentrações superiores inibem seu crescimento em meio líquido. É importante destacar que o declínio na concentração de etanol foi observado também no ensaio controle (sem célula), indicando possível evaporação (dados não apresentados). Apesar das diferenças de tolerância observadas, *S. passalidarum* manteve a viabilidade celular ao longo do ensaio de crescimento, indicando que o etanol possivelmente inibe seu crescimento sem causar morte celular (Fig. 1C).

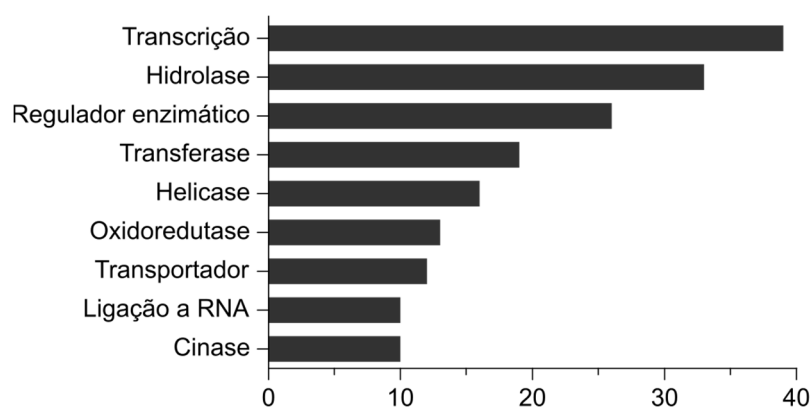


**Figura 1.** Avaliação da produção e tolerância ao etanol em *S. passalidarum*. A) Ensaio de tolerância a etanol em meio líquido. Os valores apresentados são relativos ao controle (0% de etanol) e as medidas de D.O.<sub>600</sub> foram obtidas após 48 h de crescimento. B) Ensaios de *spotting* em meio YPX (*S. passalidarum*) ou YPD (*S. cerevisiae*) contendo etanol nas concentrações indicadas. As fotografias foram obtidas após três dias de crescimento em estufa a 30 °C. C) Perfil de fermentação de *S. passalidarum* em meio YPX na ausência e presença de etanol (v/v). Alíquotas retiradas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h foram utilizadas para quantificação de xilose (●), etanol (□), mensuração de D.O.<sub>600</sub> (▲) e avaliação da viabilidade celular (Δ).

### **Análise de proteínas de *S. passalidarum* ortólogas de *S. cerevisiae* evidencia grande diversidade nas seqüências dos fatores de transcrição**

A análise de OrthoMCL identificou 501 proteínas únicas de *S. cerevisiae*. Dentre essas, 300 proteínas apresentam função conhecida anotada no SGD (Arquivo suplementar S3). Dentre as categorias de funções

moleculares identificadas na ontologia gênica (Figura 2), a mais representativa engloba proteínas envolvidas com o processo transcricional (39 proteínas), sendo 30 fatores de transcrição<sup>37</sup>. Alguns desses fatores de transcrição medeiam respostas a diferentes tipos de estresse (como oxidativo, térmico, osmótico, ácidos orgânicos, deficiência de nitrogênio e carência de aminoácidos)<sup>67</sup> e apresentam importante papel na resposta ao estresse por etanol, como Msn2p/Msn4p<sup>16</sup>. Além disso, fatores de transcrição como Fkh1p/Fkh2p estão envolvidos com o controle da progressão do ciclo celular, evento importante na adaptação de leveduras ao estresse<sup>68</sup>.



**Figura 2.** Análise da ontologia gênica das proteínas únicas identificadas em *S. cerevisiae*. As nove categorias mais representativas estão apresentadas em função da quantidade absoluta de proteínas identificadas.

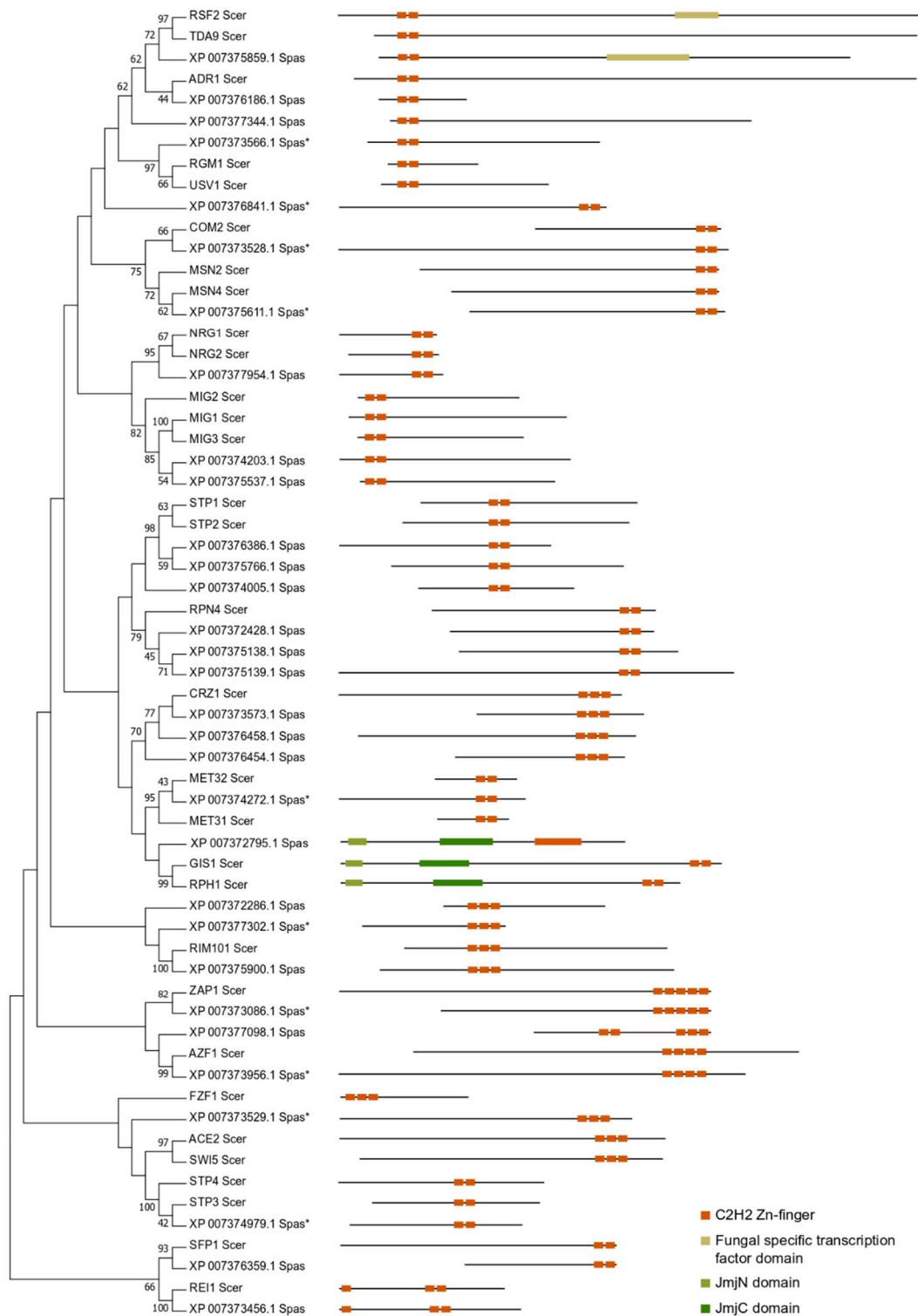
Os fatores de transcrição de *S. cerevisiae* utilizados na análise de tBLASTn foram agrupados em 33 famílias, de acordo com o domínio de ligação ao DNA. Para a definição de ortólogos putativos, foram avaliadas as árvores filogenéticas e as estruturas primárias das proteínas (Figura 3; Arquivo suplementar S4). Cento e quarenta e nove fatores de transcrição putativos foram identificados em *S. passalidarum*. Dentre esses, 105 são putativos ortólogos de *S. cerevisiae*, 44 são proteínas únicas de *S. passalidarum* e 42 são únicos de *S. cerevisiae* (Arquivo suplementar S5). Vinte e seis fatores de transcrição identificados em *S. passalidarum* apresentam duas ou mais cópias em *S. cerevisiae* – fenômeno comum devido ao evento evolutivo de duplicação do genoma de leveduras (*Whole-Genome duplication*, WGD)<sup>69</sup>. A distribuição dos fatores de transcrição nas

famílias proteicas é muito similar entre as leveduras (Figura 4A e 4B). Exceto pelo domínio característico AFT, *S. passalidarum* possui fatores de transcrição de todas as famílias. Ao total, 43 sequências tiveram suas anotações manualmente corrigidas em comparação ao draft do NCBI (SPAPADRAFT).

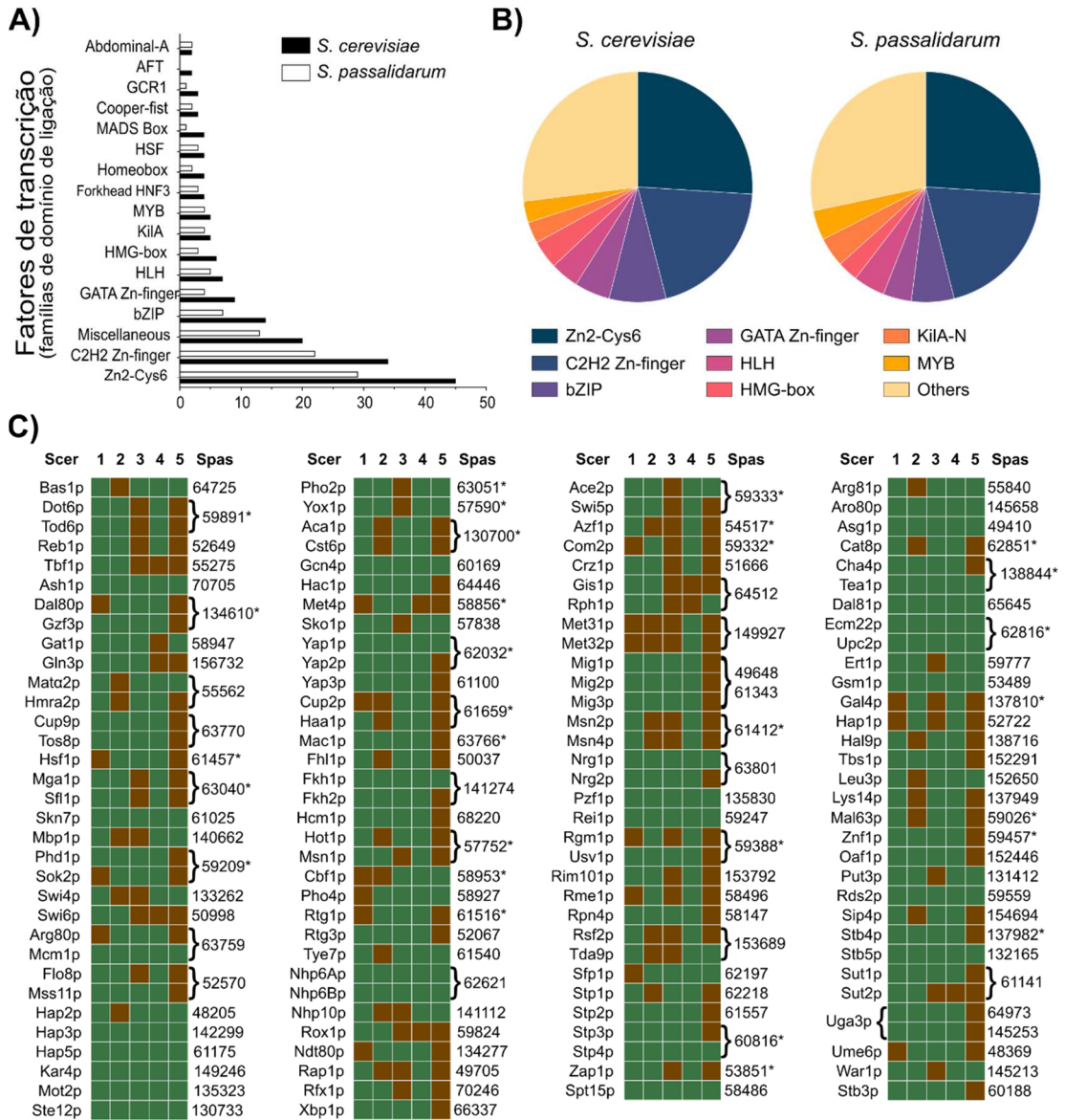
As sequências dos fatores de transcrição ortólogos de *S. cerevisiae* e *S. passalidarum* foram utilizadas para determinação de diferentes parâmetros, avaliados de forma binária na construção gráfica (Arquivo suplementar S5, Figura 4C). O valor definido de identidade global é apenas um parâmetro comparativo para mensurar a conservação das sequências e não para confirmação de homologia<sup>70</sup>. Dentre os ortólogos putativos, apenas 18 (~ 14%) apresentaram cobertura inferior a 70%, enquanto 83 (~ 64%) apresentaram identidade global inferior a 30%. Além disso, 25% dos alinhamentos indicaram diferenças na identidade global e na composição de domínios (ausência ou presença) dos ortólogos e 15% apresentaram diferenças em três características ou mais.

### **Os fatores de transcrição ortólogos de *S. passalidarum* e *S. cerevisiae* não apresentam sintenia**

Os 149 fatores de transcrição putativos de *S. passalidarum* estão distribuídos ao longo do genoma com 33, 26, 21, 33, 13, 12, 4 e 7 nos scaffolds de 1 a 8, respectivamente (Arquivo suplementar S6). Entre os 105 ortólogos putativos, a maior parte se encontra nos scaffolds 1, 2 e 4 (25, 19 e 23 proteínas, respectivamente). As localizações dos fatores de transcrição de *S. cerevisiae* foram recuperadas do SGD (<https://www.yeastgenome.org/>) e o mapa de sintenia apresentou pouca conservação, indicado pela aparente ausência de blocos de sintenia<sup>71</sup>.



**Figura 3.** Análise filogenética e estrutural dos fatores de transcrição de *S. cerevisiae* (Scer) e *S. passalidarum* (Spas) da família proteica contendo domínios C2H2 Zn-finger. As estruturas primárias das proteínas foram desenhadas a partir da predição de domínios proteicos pelo Pfam e InterPro. Proteínas marcadas com asterisco (\*) indicam seqüências de *S. passalidarum* com anotação incompleta no NCBI.

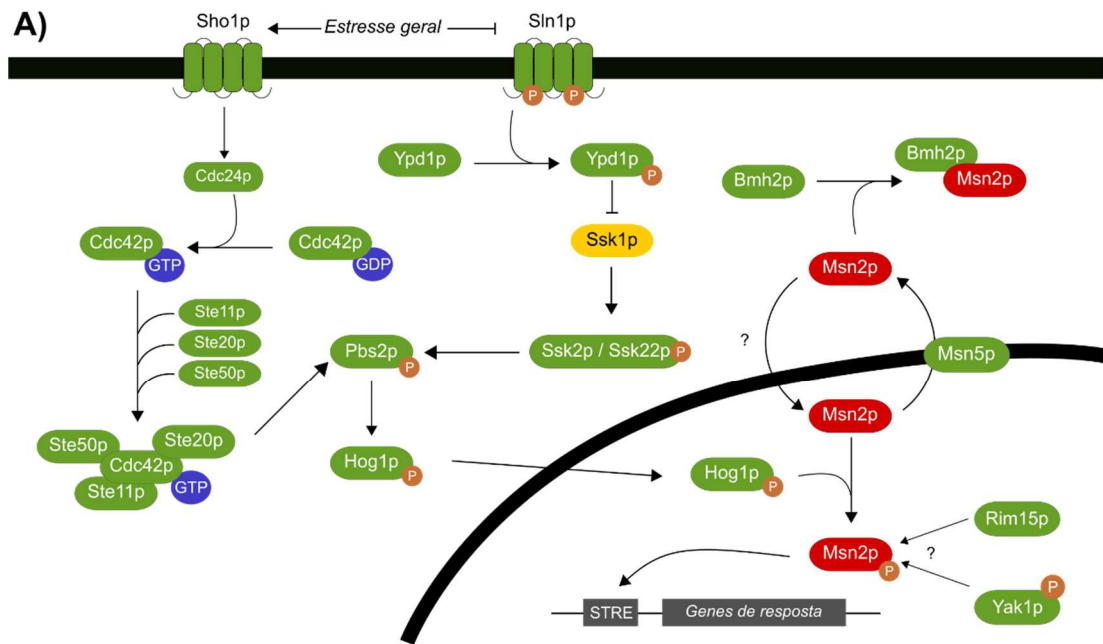


**Figura 4.** Inventário dos fatores de transcrição de *S. cerevisiae* e *S. passalidarum*. Distribuição absoluta (A) e relativa (B) dos fatores de transcrição nas diferentes famílias, baseado nos domínios de ligação ao DNA. Os parâmetros preditos (C) foram distribuídos em colunas (1 – 5) e visualmente comparados, de acordo com os *cutoffs* a seguir: 1, tamanho (verde: cobertura > 70%); 2, ponto isoelétrico (verde: diferença  $\pm 1.0$ ); 3, domínios (verde: mesmos domínios identificados); 4, Domínio de ligação ao DNA (verde: Localização similar); 5, identidade global (verde: identidade > 30%). Sequências duplicadas foram marcadas por chaves e proteínas marcadas com asterisco (\*) indicam sequências de *S. passalidarum* com anotação incompleta no NCBI. *Miscellaneous* compreende famílias contendo apenas um representante. Scer, *S. cerevisiae*. Spas, *S. passalidarum*. Os números na coluna de Spas correspondem ao número identificador da sequência anotada (formato SPAPADRAFT\_número). Os números de acesso podem ser obtidos no arquivo suplementar S5.

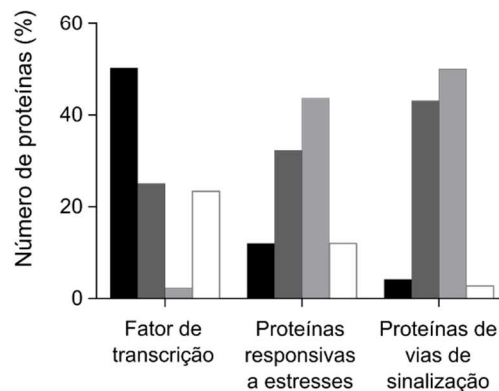
## ***S. passalidarum* possui vias de sinalização de estresses conservadas**

A identificação dos componentes das vias de sinalização de *S. cerevisiae* foi feita por meio da literatura. A busca de ortólogos de *S. passalidarum* foi realizada por meio de análise filogenética. As proteínas ortólogas putativas identificadas tiveram seus parâmetros anotados, de forma similar aos fatores de transcrição. Nas vias de sinalização (Figura 5A; arquivo suplementar S7), as proteínas verdes apresentam características similares (tamanho, pl, domínios identificados e identidade global), proteínas amarelas apresentam alteração em apenas um parâmetro e proteínas vermelhas apresentam alterações em 2 ou mais.

O que se observa é uma ampla conservação nas proteínas componentes da via de sinalização, com acentuadas diferenças nos fatores de transcrição. As proteínas regulatórias da atividade de Msn2/4p são muito conservadas, apresentando identidade superior a 30%, tamanhos e pl similares, bem como os mesmos domínios, à exceção de Ssk1p (pl diferente). Para os fatores de transcrição Msn2/4p, as diferenças são amplas: *S. passalidarum* possui apenas uma cópia, apresentando diferente pl e identidade global inferior a 30%. Além do fator de transcrição, a kinase Ssk2/22p também apresenta apenas uma cópia em *S. passalidarum*, mas os demais parâmetros são similares. A via de ativação de outros fatores de transcrição, como Hsf1p, apresenta proteínas também conservadas. Entretanto, o fator de transcrição apresenta diferenças quanto ao tamanho e identidade. Para os mecanismos de resposta a danos causados a parede celular, a situação não é diferente: é possível notar mecanismos de sinalização similares, embora os fatores de transcrição ortólogos sejam diferentes (Swi4p, Swi6p) ou mesmo inexistentes (Rlm1p).



**B)**



**Figura 5.** Análise da conservação de mecanismos de sinalização e resposta em *S. passalidarum*. A) Reconstrução da via HOG e ativação de Msn2/4p. Verde, ortólogos conservados (cobertura, identidade, pl e domínios). Amarelo, ortólogos com variação de apenas um parâmetro. Vermelho, ortólogos com variação de dois ou mais parâmetros anteriormente descritos. B) Identidade global de proteínas componentes de diferentes processos celulares. Preto, identidade < 30%; Cinza-escuro, identidade 30 – 50%; Cinza-claro, identidade > 50%; Branco, proteínas únicas de *S. cerevisiae*.

Ao total, foram avaliados 171 fatores de transcrição, 300 genes de resposta a estresse e 52 proteínas componentes de sete vias de sinalização quanto a identidade global. Ao avaliar a distribuição das proteínas com relação a identidade (Figura 5B), é possível notar que há pouca conservação dos fatores de transcrição, uma vez que cerca de 70% destes apresentam identidade inferior a 30% ou são exclusivos de *S. cerevisiae*. A identidade

das proteínas de resposta a estresse e componentes de vias de sinalização é superior a 30% em mais de 70 e 90% das sequências avaliadas, respectivamente.

### **Genes responsivos ao estresse por etanol em *S. cerevisiae* não são induzidos em *S. passalidarum***

Para avaliar o impacto do estresse por etanol sobre a transcrição de genes envolvidos em diferentes mecanismos de resistência<sup>16,72,73</sup>, treze genes de *S. passalidarum* – ortólogos de *S. cerevisiae* – foram selecionados, compreendendo processos de metabolismo de carbono e fermentação (*ADH1*, *ADH7*, *GND2*, *TDH1*, *TPS1* and *ZWF1*), desagregação de proteínas (*HSP104*), regulação de ATPase de membrana (*HSP30*), biossíntese de aminoácidos (*ARG3*), biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados (*OLE1*), detoxificação de superóxidos (*SOD1*), e fator de transcrição de resposta a diversos estresses (*MSN2/4*). Sob estresse, a expressão dos genes *ADH1*, *HSP30*, *MSN2/4*, *TDH1* e *TPS1* foi down-regulada, enquanto a expressão de *SOD1* foi up-regulada (Figura 6). Os demais genes não apresentaram diferenças significativas de expressão na presença de etanol.

### **A divergência dos fatores de transcrição é alta entre diferentes espécies de leveduras**

Para compreender melhor as divergências dos mecanismos de resposta avaliados, 14 proteínas efetoras e 3 fatores de transcrição foram utilizadas para a construção de matrizes de identidade entre organismos diversos (Figura 7; arquivo suplementar S8). Os fatores de transcrição analisados (*Msn2/4p*, *Hsf1p* e *Yap1p*) apresentaram sequências bem divergentes, com pequenos grupos de maior identidade – observados entre espécies do gênero *Saccharomyces*. Ao avaliar seus domínios de ligação ao DNA, as estruturas primárias são conservadas e apresentam alta identidade (acima de 70%; dados não apresentados), indicando que o restante da sequência é responsável pelas diferenças observadas.

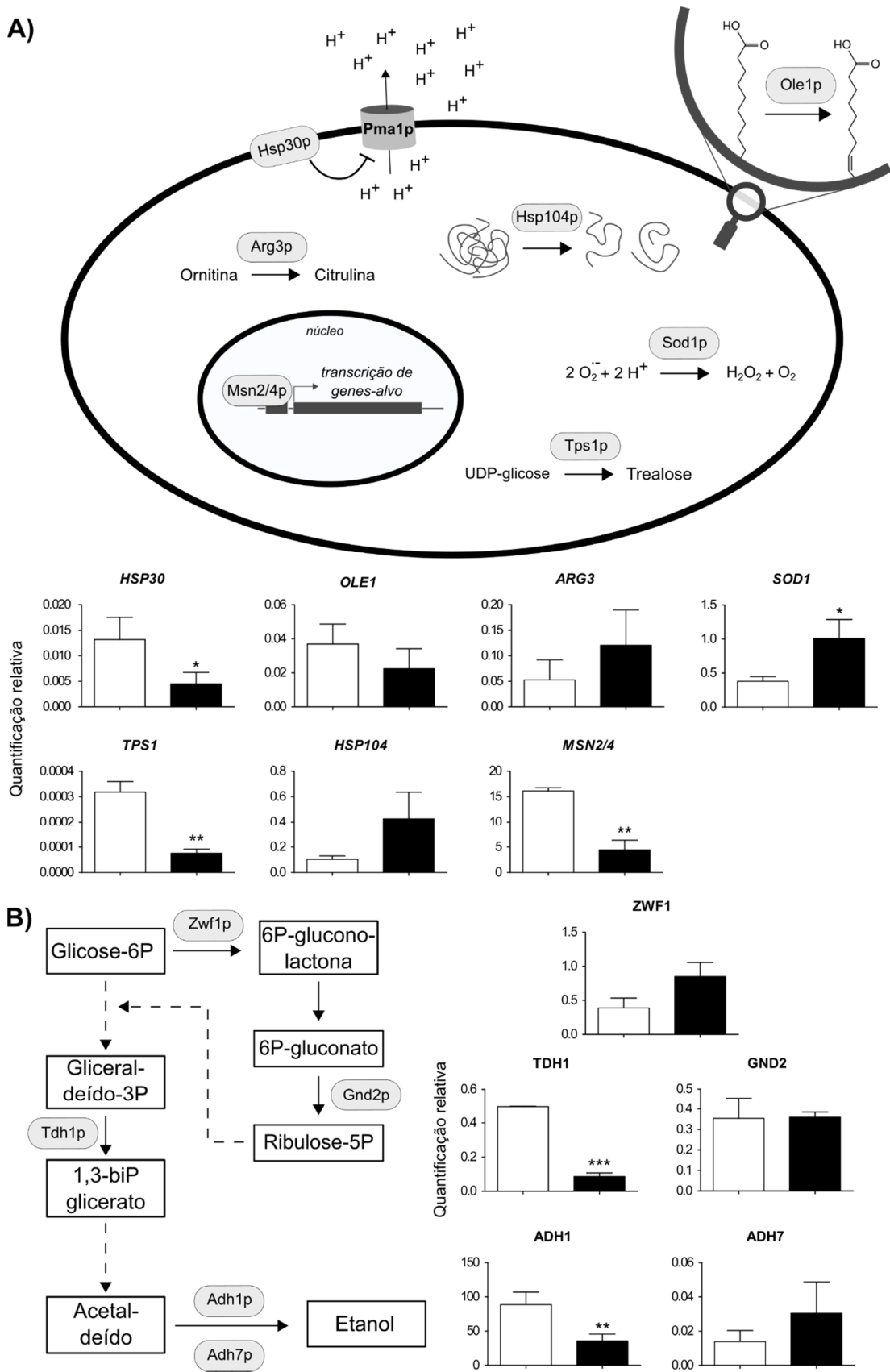
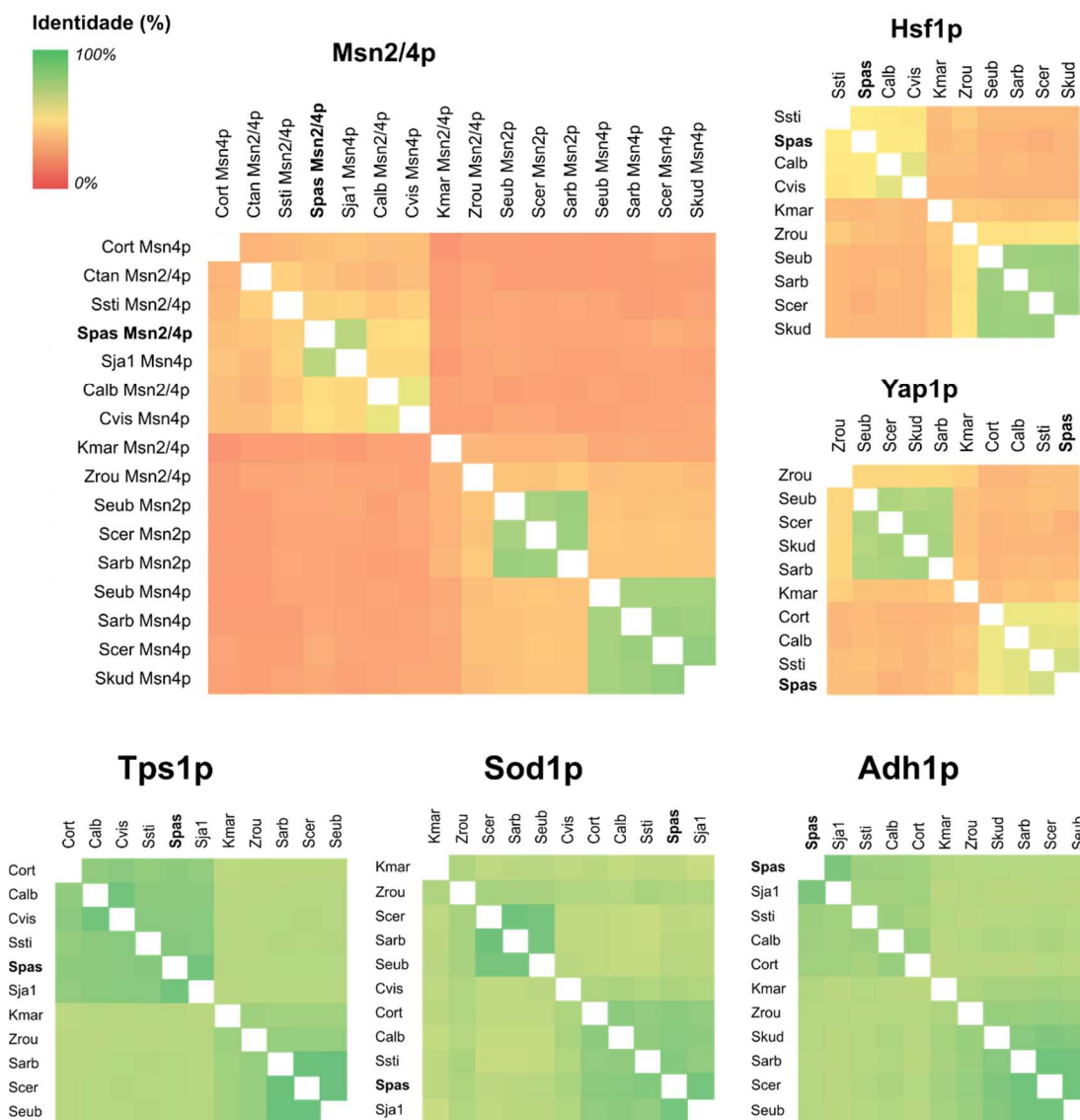


Figura 6. Continua...

**Figura 6.** Análise da expressão de genes responsivos ao estresse por etanol em *S. passalidarum*. A) Mecanismos moleculares diversos envolvidos na contenção dos danos celulares causados pelo etanol. B) Genes do metabolismo central de carbono. As quantificações foram realizadas na ausência (■) e presença (■, 4% v/v) de etanol e os gráficos representam o valor da média e desvio-padrão estimados. As análises estatísticas foram conduzidas por meio de teste-t e as médias significativamente diferentes são apresentadas com asterisco (\*, p-value < 0.05; \*\*, p-value < 0.01; \*\*\*, p-value < 0.001).

Ao avaliar as demais proteínas, nota-se uma ampla conservação da sequência primária entre os diferentes organismos. De modo geral, as proteínas apresentaram matrizes com identidades superiores a 60%, bem como tamanho e domínios funcionais semelhantes. A análise de cis-elementos (Arquivo suplementar S9) da região promotora desses genes em *S. passalidarum* indicou que treze possuem sítios de ligação para Msn2/4p, doze para Yap1p e oito para Hsf1p. Os genes *ADH1*, *ADH7* e *GND2* (Hsf1p, Msn2/4p e Yap1p), *ARG3* (Hsf1p), *SOD1* e *ZWF1* (Msn2/4p e Yap1p) apresentaram os mesmos cis-elementos entre *S. passalidarum* e *S. cerevisiae*. Além disso, em todos os promotores dos demais genes foi identificado pelo menos um cis-elemento em comum entre as espécies, exceto por *OLE1*.



**Figura 7.** Matrizes de identidade de proteínas responsivas a estresses de 13 organismos diferentes. Fatores de transcrição (Msn2/4p, Hsf1p, Yap1p), proteínas de metabolismo de carbono (Adh1p), de biossíntese de trealose (Tps1p) e detoxificação de superóxidos (Sod1p) foram utilizadas para avaliação da conservação das sequências das proteínas entre os organismos. Calb, *Candida albicans* SC5314; Cort, *Candida orthopsilosis* Co 90-125; Ctan, *Candida tanzawaensis* NRRL Y-17324; Cvis, *Candida viswanathii*; Kmar, *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042; Sarb, *Saccharomyces arboricola* H6; Scer, *Saccharomyces cerevisiae* S288C; Seub, *Saccharomyces eubayanus*; Sja1, *Spathaspora* sp. JA1; Skud, *Saccharomyces kudriavzevii* IFO1802; Spas, *Spathaspora passalidarum*; Ssti, *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054; Zrou, *Zygosaccharomyces rouxii*.

## DISCUSSÃO

A levedura *S. passalidarum* tem sido alvo de estudos nos últimos anos, devido sua capacidade de fermentar xilose e outros açúcares com eficiência, apresentando altos rendimentos de etanol, principalmente condições de oxigenação limitadas<sup>11,13,64,74,75</sup>. Entretanto, pouco se sabe sobre sua tolerância ao etanol, que pode limitar crescimento celular e viabilidade, afetando diretamente a capacidade fermentativa<sup>15</sup>. Compreender os mecanismos de adaptação ao estresse é essencial para a utilização do micro-organismo em processos industriais, uma vez que a concentração de etanol em dornas de fermentação atinge valores superiores a 9% (v/v) em processos economicamente viáveis<sup>76</sup>.

Ao avaliar a fermentação de *S. passalidarum* em elevadas concentrações de xilose (100 g.L<sup>-1</sup>) ou da mistura xilose (100 g.L<sup>-1</sup>) e glicose (40 g.L<sup>-1</sup>), não se obteve concentrações de etanol superiores a 40 g.L<sup>-1</sup> (artigo submetido), valores condizentes com dados observados na literatura<sup>12,31</sup>. Su *et al.* obtiveram concentrações superiores a 50 g.L<sup>-1</sup> de etanol (~ 7% v/v) em ensaios de fermentação com *S. passalidarum* utilizando meio enriquecido<sup>14</sup>. Entretanto, é possível observar que após atingir 40 g.L<sup>-1</sup> de etanol no meio de cultura, *S. passalidarum* apresentou redução no consumo de xilose, na produtividade de etanol e no crescimento celular. Ao atingir concentrações de etanol próximas de 5% (v/v), *S. passalidarum* promove uma parada do metabolismo, reduzindo taxa de crescimento e consumo de xilose, bem como suspendendo a fermentação alcoólica (Figura 1). Os resultados de qPCR (Figura 6B) mostraram down-regulação dos genes *ADH1* (alcohol dehydrogenase) e *TDH1* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), em acordo com os resultados fisiológicos. Possivelmente, *S. passalidarum* reduz a produção de etanol para minimizar a amplitude do estresse. Ao mesmo tempo, na presença de 4% (v/v) de etanol (Figura 1C), a levedura é capaz de crescer e consumir xilose, indicando que a obtenção de energia para proliferação celular deve ocorrer por meio da respiração. Esse mecanismo é importante para regeneração de NAD<sup>+</sup>, uma vez que diferentes reações da via glicolítica fazem uso desse co-fator<sup>77</sup>.

A regulação da expressão gênica mediada por fatores de transcrição é um importante mecanismo de adaptação aos estímulos ambientais. Diferentes trabalhos apontam importantes alterações transcricionais que contribuem para a tolerância ao etanol em *S. cerevisiae*<sup>15-18</sup>. A análise de proteínas ortólogas indicou um amplo número de fatores de transcrição exclusivos de *S. cerevisiae*, como Gcr1p (ativador de genes envolvidos na via glicolítica e determinante na resistência ao etanol)<sup>61</sup> e Pdr1/3p (envolvidos na tolerância a etanol e na resistência cruzada a diversos estímulos como calor, osmolaridade e espécies oxidativas)<sup>16,67</sup>. Entre os ortólogos identificados, fica clara a existência de diferenças e/ou de cópias adicionais em *S. cerevisiae* para a maioria dos fatores de transcrição (Figura 4). Os transfatores Msn2p e Msn4p, por exemplo, apresentam baixa identidade entre as espécies e cópia única em *S. passalidarum*. Ainda, Hsf1p possui tamanhos diferentes e baixa identidade de sequência. As divergências encontradas nos fatores de transcrição podem afetar diretamente modificações pós-traducionais, interação proteína-proteína e formação de complexos proteicos<sup>39</sup>. As modificações pós-traducionais, como fosforilação, podem alterar a localização celular, a afinidade de ligação ao DNA e, conseqüentemente, a ativação ou inibição da expressão gênica<sup>78</sup>. A importância desse mecanismo de controle de ativação dos transfatores fica evidente na substituição de resíduos de serina (alvos de fosforilação) por alanina em Msn2p: estudos recentes mostraram que a substituição de apenas um resíduo é o suficiente para alterar a capacidade fermentativa e a tolerância ao etanol de linhagens de *S. cerevisiae*<sup>24</sup>, enquanto a substituição simultânea de seis resíduos mimetiza um cenário de hiperativação do fator de transcrição, letal para a célula<sup>79</sup>. Já para Spt15p (TATA-binding protein), a substituição de um resíduo de serina por fenilalanina promove aumento da tolerância ao etanol e eficiência de fermentação, possivelmente intermediado pela formação do complexo proteico Spt3p-Spt15p-SAGA, que afeta a transcrição de diversos genes<sup>80</sup>. De forma similar, a alteração de apenas um aminoácido (serina por fenilalanina) em Haa1p é capaz de tornar *S. cerevisiae* mais tolerante ao ácido acético, por meio do aumento da eficiência de recrutamento da maquinaria de transcrição<sup>81</sup>.

Diante da importância do controle da reprogramação gênica e aparato bioquímico em respostas ao estresse, a reconstrução de vias de sinalização e identificação de proteínas efetoras de resposta a estresses pode auxiliar no maior entendimento desses mecanismos nas diferentes espécies. Os resultados evidenciaram maior conservação desses componentes nas leveduras (Figuras 4, 5 e 7), com domínios funcionais similares e altos valores de cobertura e identidade. É curioso notar que mais de 70% das proteínas responsivas ou envolvidas na sinalização a estresses compartilham identidades superiores a 30%. No entanto, para os fatores de transcrição observa-se o inverso: mais de 70% das proteínas apresentam baixa identidade ou são exclusivas de *S. cerevisiae*. Esses resultados, concomitante a análise de sintenia, apontam para a diferença evolutiva entre fatores de transcrição como possível explicação para os diferentes perfis fisiológicos. Assim, a baixa tolerância de *S. passalidarum* ao estresse pode ser parcialmente causada por diferenças transcricionais em comparação a *S. cerevisiae*, e não apenas pela existência de mecanismos celulares diferentes. Estudos de complementação de *S. cerevisiae* duplo knockout (*msn2Δ/msn4Δ*) utilizando genes *MSN-like* de *C. albicans* apontaram para a incapacidade da recuperação da tolerância ao etanol<sup>82</sup>. A expressão heteróloga dos genes *HSF1* e *MSN2* de *K. marxianus* (levedura termotolerante) em *S. cerevisiae* foi capaz de aumentar sua tolerância ao estresse térmico, permitindo crescimento celular e fermentação a altas temperaturas, em função da expressão diferencial de mais de 50 genes<sup>83</sup>. Esses trabalhos evidenciam que, independente da manutenção dos mecanismos de resposta celular, as possíveis alterações na transcrição de um amplo conjunto de genes é o suficiente para afetar a adaptação das leveduras a estímulos ambientais.

Para os genes *ARG3*, *GND2*, *ZWF1* e *HSP104*, não foram identificadas diferenças significativas na expressão após o estresse em *S. passalidarum*. É curioso não ver alteração da expressão de *HSP104* – chaperona com função de disagregase responsiva a uma variedade ampla de estímulos ambientais, como estresse térmico, osmótico e oxidativo<sup>84</sup>. Em *S. cerevisiae*, sua expressão é crescente com o aumento da concentração

de etanol<sup>85</sup>, sendo regulada por diversos fatores de transcrição, como Msn2/4p e Hsf1p – que podem atuar exclusiva- ou cooperativamente<sup>86</sup>. Essa complexa regulação permite um controle fino da regulação, capaz de responder a muitos estímulos. Em *S. passalidarum*, a região promotora desse gene também apresenta cis-elementos de ligação a Hsf1p e Msn2/4p, mas as diferenças nos fatores de transcrição podem implicar em menor eficiência de ativação da transcrição de *HSP104*.

A down-regulação de *TPS1* e *HSP30* sob estresse é diferente do observado para *S. cerevisiae*, que apresenta aumento da expressão desses genes na presença de etanol<sup>21</sup>. O acúmulo de trehalose em *S. cerevisiae* está relacionado à maior resistência a diversas condições adversas, e a superexpressão de *TPS1* (trehalose-6-phosphate synthase) contribui para aumento da tolerância ao etanol<sup>87</sup>. A down-regulação desse gene possivelmente leva a menor produção e acúmulo de trehalose, tornando a célula mais susceptível ao estresse. Já Hsp30p é uma heat shock protein integral de membrana, responsável por inibir Pma1p, uma H<sup>+</sup>-ATPase de membrana envolvida na desacidificação citosólica na presença de etanol<sup>88,89</sup>. Assim, a expressão reduzida de *HSP30* indica que *S. passalidarum* alivia a inibição sobre Pma1p, permitindo maior atividade dessa bomba de prótons e consequente desacidificação citosólica. Possivelmente, para minimizar os impactos causados pelo etanol, a levedura retarda a fermentação e seu crescimento, direciona o metabolismo para a respiração e garante tanto a produção de ATP, necessário para funcionamento de Pma1p, quanto a não-elevação das concentrações de etanol no meio, coerente com os dados de fisiologia.

O único gene up-regulado – *SOD1* (Cu/Zn superoxide dismutase) – está envolvido na detoxificação de superóxidos e sua expressão é induzida na existência de estresses oxidativos – também causados pela presença do etanol<sup>90</sup>. A formação de superóxidos pode levar a apoptose celular, afetando lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos<sup>91</sup>. Estudos apontam que a superexpressão de *SOD1* é o suficiente para promover aumento da tolerância a etanol em linhagens de *S. cerevisiae*<sup>92</sup>. Assim, é possível que *S. passalidarum* use esse mecanismo para manter a viabilidade celular,

reduzindo os danos causados por ROS. Possivelmente a expressão similar de *SOD1* pode ser explicada pela maior conservação de Yap1p e Skn7p, fatores de transcrição essenciais para a indução desse gene<sup>93</sup>.

Por fim, houve down-regulação de MSN-like em *S. passalidarum*. Msn2p e Msn4p são fatores de transcrição parcialmente redundantes responsáveis pelo controle de mais de 200 genes, envolvidos em diversos processos. Mutantes duplos em *S. cerevisiae* apresentam alta sensibilidade a estresses, incluindo ao etanol<sup>22</sup>. Assim, a existência de apenas uma proteína MSN-like (Figura 3) em *S. passalidarum*, a ampla divergência das sequências ortólogas (Figuras 4 e 7) e a down-regulação desse fator de transcrição no estresse (Figura 6) podem contribuir para a regulação dos outros genes avaliados, uma vez que a maioria deles apresenta o cis-elemento STRE em seus promotores – motivo característico de ligação a Msn2/4p.

Em conclusão, nossos resultados indicam que a divergência na sequência primária ou a ausência de fatores de transcrição constituem importantes mecanismos envolvidos na tolerância ao etanol. Embora *S. passalidarum* seja menos tolerante ao etanol, ela apresenta mecanismos conservados de resposta ao estresse, como vias de sinalização e proteínas efetoras. Em contrapartida, a análise dos fatores de transcrição de *S. passalidarum* indicou divergências evolutivas consideráveis em suas sequências primárias. A evolução do controle transcricional pode estar envolvida com a diversidade morfológica e fisiológica entre espécies diferentes de leveduras<sup>94,95</sup>, e dois processos distintos podem co-existir: *i*) a evolução dos cis-elementos na região promotora dos genes; e *ii*) a evolução dos fatores de transcrição e sua capacidade de ligação ao DNA<sup>96-99</sup>. As divergências observadas entre os ortólogos podem culminar em diferenças nos processos de modificação pós-traducional, interação proteína-proteína, localização nuclear e/ou funcionalidade<sup>39</sup>. De fato, essa ampla variação pode afetar diversas redes transcricionais de resposta a estímulos ambientais, alterando os níveis de expressão de centenas de genes. Como observado, *S. passalidarum* não consegue induzir a expressão de alguns genes envolvidos na tolerância ao etanol e o estresse força a parada do

metabolismo fermentativo. Juntos, esses resultados indicam que a resposta ao estresse não é exclusivamente dependente de proteínas efetoras. Mais que isso, a adaptação eficiente ocorre mediante uma complexa rede de controle da expressão gênica, fortemente influenciada pelos fatores de transcrição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Basic A, Mardetko N, Kundas S, *et al.* Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol Biotechnol.* 2018;56(3):289-311.
2. Maurya DP, Singla A, Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech.* 2015;5(5):597-609.
3. Pena-Castro JM, Del Moral S, Nunez-Lopez L, Barrera-Figueroa BE, Amaya-Delgado L. Biotechnological Strategies to Improve Plant Biomass Quality for Bioethanol Production. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7824076.
4. Abo BO, Gao M, Wang Y, Wu C, Ma H, Wang Q. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Rev Environ Health.* 2019.
5. Mohd Azhar SH, Abdulla R, Jambo SA, *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Rep.* 2017;10:52-61.
6. Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2016;66:751-774.
7. Sharma NK, Behera S, Arora R, Kumar S, Sani RK. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *J Biosci Bioeng.* 2018;125(3):259-267.
8. Moyses DN, Reis VC, de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):207.
9. Cadete RM, Santos RO, Melo MA, *et al.* *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(8):1338-1342.
10. Martiniano SE, Chandel AK, Soares LC, Pagnocca FC, da Silva SS. Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. *3 Biotech.* 2013;3(5):345-352.
11. Nguyen NH, Suh SO, Marshall CJ, Blackwell M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol Res.* 2006;110(Pt 10):1232-1241.
12. Long TM, Su YK, Headman J, Higbee A, Willis LB, Jeffries TW. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5492-5500.
13. Hou X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;94(1):205-214.

14. Su YK, Willis LB, Jeffries TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112(3):457-469.
15. Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 2010;109(1):13-24.
16. Ma M, Liu LZ. Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* 2010;10:169.
17. Ramirez-Cordova J, Drnevich J, Madrigal-Pulido JA, *et al.* Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in Agave tequilana juice. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012;102(2):247-255.
18. Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2001;498(1):98-103.
19. Auesukaree C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J Biosci Bioeng.* 2017;124(2):133-142.
20. Navarro-Tapia E, Nana RK, Querol A, Perez-Torrado R. Ethanol Cellular Defense Induce Unfolded Protein Response in Yeast. *Front Microbiol.* 2016;7:189.
21. Ma M, Liu ZL. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(3):829-845.
22. Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo j.* 1996;15(9):2227-2235.
23. Watanabe M, Watanabe D, Akao T, Shimoi H. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J Biosci Bioeng.* 2009;107(5):516-518.
24. Vamvakas SS, Kapos J, Farmakis L, *et al.* Specific serine residues of Msn2/4 are responsible for regulation of alcohol fermentation rates and ethanol resistance. *Biotechnol Prog.* 2018.
25. Wu G, Xu Z, Jonsson LJ. Profiling of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factors for engineering the resistance of yeast to lignocellulose-derived inhibitors in biomass conversion. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):199.
26. Zyrina AN, Smirnova EA, Markova OV, Severin FF, Knorre DA. Mitochondrial Superoxide Dismutase and Yap1p Act as a Signaling Module Contributing to Ethanol Tolerance of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(3).

27. Bonner JJ, Carlson T, Fackenthal DL, Paddock D, Storey K, Lea K. Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. *Mol Biol Cell*. 2000;11(5):1739-1751.
28. Noguchi C, Watanabe D, Zhou Y, Akao T, Shimoi H. Association of constitutive hyperphosphorylation of Hsf1p with a defective ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(2):385-392.
29. Qiu Z, Jiang R. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnol Biofuels*. 2017;10.
30. Wohlbach DJ, Kuo A, Sato TK, *et al*. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(32):13212-13217.
31. Nakanishi SC, Soares LB, Biazi LE, *et al*. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol Bioeng*. 2017;114(10):2211-2221.
32. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, *et al*. Life with 6000 genes. *Science*. 1996;274(5287):546, 563-547.
33. Hirschman JE, Balakrishnan R, Christie KR, *et al*. Genome Snapshot: a new resource at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) presenting an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D442-445.
34. Li L, Christian J, Stoekert J, Roos DS. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Research*. 2003.
35. Fischer S, Brunk BP, Chen F, *et al*. Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2011;CHAPTER:Unit-6 1219.
36. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410.
37. Teixeira MC, Monteiro PT, Palma M, *et al*. YEASTRACT: an upgraded database for the analysis of transcription regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 2017;46(D1):D348-d353.
38. Kumar S, Institute for Genomics and Evolutionary Medicine TU, Department of Biology TU, *et al*. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016;33(7):1870-1874.
39. Hahn S, Young ET. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. In: *Genetics*. Vol 189.2011:705-736.
40. El-Gebali S, European Molecular Biology Laboratory EBIE-E, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD,

- UK, Mistry J, *et al.* The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*. 2018.
41. Rojas-Ortega E, Aguirre-López B, Reyes-Vivas H, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Differential Functionalization of Presumed ScALT1 and ScALT2 Alanine Transaminases Has Been Driven by Diversification of Pyridoxal Phosphate Interactions. *Front Microbiol*. 2018;9.
  42. Baker RE, Rogers K. Phylogenetic Analysis of Fungal Centromere H3 Proteins. In: *Genetics*. Vol 174.2006:1481-1492.
  43. Kocot KM, Citarella MR, Moroz LL, Halanych KM. PhyloTreePruner: A Phylogenetic Tree-Based Approach for Selection of Orthologous Sequences for Phylogenomics. In: *Evol Bioinform Online*. Vol 9.2013:429-435.
  44. Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, *et al.* InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D211-215.
  45. Sievers F, Wilm A, Dineen D, *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7:539.
  46. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol*. 2014;1079:105-116.
  47. Krzywinski M, Schein J, Birol Í, *et al.* Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*. 2009.
  48. Walther A, Hesselbart A, Wendland J. Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast. In: *G3 (Bethesda)*. Vol 4.2014:783-793.
  49. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(2):300-372.
  50. Posas F, Saito H. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *Embo j*. 1998;17(5):1385-1394.
  51. Lee P, Kim MS, Paik SM, Choi SH, Cho BR, Hahn JS. Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 2013;587(22):3648-3655.
  52. Krakowiak J, Zheng X, Patel N, *et al.* Hsf1 and Hsp70 constitute a two-component feedback loop that regulates the yeast heat shock response. *Elife*. 2018;7.
  53. Pérez-Landero S, Sandoval-Motta S, Martínez-Anaya C, *et al.* Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational evidences. In: *BMC Syst Biol*. Vol 9.2015.
  54. Fassler JS, West AH. Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryot Cell*. 2011;10(2):156-167.

55. Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, *et al.* The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 2000;11(7):2335-2347.
56. He XJ, Mulford KE, Fassler JS. Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell.* 2009;8(5):768-778.
57. Yan C, Lee LH, Davis LI. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* 1998;17(24):7416-7429.
58. Isoyama T, Murayama A, Nomoto A, Kuge S. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21863-21869.
59. Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2009;284(7):4464-4472.
60. Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012;190(4):1157-1195.
61. Teixeira MC, Raposo LR, Mira NP, Lourenco AB, Sa-Correia I. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(18):5761-5772.
62. Solis EJ, Pandey JP, Zheng X, *et al.* Defining the Essential Function of Yeast Hsf1 Reveals a Compact Transcriptional Program for Maintaining Eukaryotic Proteostasis. *Mol Cell.* 2016;63(1):60-71.
63. Okada N, Ogawa J, Shima J. Comprehensive analysis of genes involved in the oxidative stress tolerance using yeast heterozygous deletion collection. *FEMS Yeast Res.* 2014;14(3):425-434.
64. Cadete RM, de las Heras AM, Sandström AG, *et al.* Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnol Biofuels.* Vol 9.2016.
65. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-74.
66. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.

67. Swiecilo A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast--new insight into an old phenomenon. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(2):187-200.
68. Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* Cells to High Ethanol Concentration and Changes in Fatty Acid Composition of Membrane and Cell Size. *PLoS One*. 2008;3(7).
69. Wolfe KH. Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLoS Biol*. 2015;13(8).
70. Pearson WR. An Introduction to Sequence Similarity ("Homology") Searching. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;0 3.
71. Drillon G, Fischer G. Comparative study on synteny between yeasts and vertebrates. *C R Biol*. 2011;334(8-9):629-638.
72. Caspeta L, Castillo T, Nielsen J. Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3.
73. Cheng Y, Du Z, Zhu H, Guo X, He X. Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. In: *Sci Rep*. Vol 6.2016.
74. Cadete RM, Rosa CA. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast*. 2018;35(2):191-199.
75. Rodrussamee N, Sattayawat P, Yamada M. Highly efficient conversion of xylose to ethanol without glucose repression by newly isolated thermotolerant *Spathaspora passalidarum* CMUWF1–2. *BMC Microbiol*. 2018;18.
76. Stambuk BU, Dunn B, Alves SL, Jr., Duval EH, Sherlock G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Res*. 2009;19(12):2271-2278.
77. Bekers KM, Heijnen JJ, van Gulik WM. Determination of the in vivo NAD:NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions, using alcohol dehydrogenase as sensor reaction. *Yeast*. 2015;32(8):541-557.
78. Oliveira AP, Sauer U. The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Res*. 2012;12(2):104-117.
79. Pfanzagl V, Gorner W, Radolf M, *et al*. A constitutive active allele of the transcription factor Msn2 mimicking low PKA activity dictates metabolic remodeling in yeast. *Mol Biol Cell*. 2018;29(23):2848-2862.
80. Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*. 2006;314(5805):1565-1568.

81. Swinnen S, Henriques SF, Shrestha R, Ho PW, Sa-Correia I, Nevoigt E. Improvement of yeast tolerance to acetic acid through Haa1 transcription factor engineering: towards the underlying mechanisms. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):7.
82. Nicholls S, Straffon M, Enjalbert B, *et al.* Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2004;3(5):1111-1123.
83. Li P, Fu X, Zhang L, Zhang Z, Li J, Li S. The transcription factors Hsf1 and Msn2 of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* promote cell growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* at high temperatures. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:289.
84. Bond U. Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(2):160-170.
85. Kempf C, Lengeler K, Wendland J. Differential stress response of *Saccharomyces* hybrids revealed by monitoring Hsp104 aggregation and disaggregation. *Microbiol Res.* 2017;200:53-63.
86. Grably MR, Stanhill A, Tell O, Engelberg D. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):21-35.
87. Divate NR, Chen GH, Divate RD, Ou BR, Chung YC. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. *Bioengineered.* 2017;8(5):524-535.
88. Aguilera F, Peinado RA, Millan C, Ortega JM, Mauricio JC. Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol.* 2006;110(1):34-42.
89. Piper PW, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones.* 1997;2(1):12-24.
90. Bleoanca I, Silva AR, Pimentel C, Rodrigues-Pousada C, Menezes Rde A. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(6):697-705.
91. Bailey SM, Pietsch EC, Cunningham CC. Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(7-8):891-900.
92. Wang H, Ji B, Ren H, Meng C. The relationship between lysine 4 on histone H3 methylation levels of alcohol tolerance genes and changes of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol.* 2014;7(4):307-314.
93. Lee J, Godon C, Lagniel G, *et al.* Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.* 1999;274(23):16040-16046.

94. de Mendoza A, Sebe-Pedros A, Sestak MS, *et al.* Transcription factor evolution in eukaryotes and the assembly of the regulatory toolkit in multicellular lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(50):E4858-4866.
95. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet.* 2007;8(2):93-103.
96. Mack KL, Nachman MW. Gene Regulation and Speciation. *Trends Genet.* 2017;33(1):68-80.
97. Rosanova A, Colliva A, Osella M, Caselle M. Modelling the evolution of transcription factor binding preferences in complex eukaryotes. *Sci Rep.* 2017;7.
98. Wagner GP, Lynch VJ. The gene regulatory logic of transcription factor evolution. *Trends Ecol Evol.* 2008;23(7):377-385.
99. Schaefer B, Wang TY, Wang CY, Li WH. Gains and Losses of Transcription Factor Binding Sites in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genome Biol Evol.* 2015;7(8):2245-2257.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Arquivo suplementar S1.** Fatores de transcrição característicos de *S. cerevisiae*, identificados em repositórios.

Código de acesso	Nome padrão	Nome sistemático	Nome completo
NP_012810.1	ABF1	YKL112W	ARS-Binding Factor 1
NP_013788.1	ABF2	YMR072W	ARS-Binding Factor
NP_010964.3	ACA1	YER045C	ATF/CREB Activator
NP_013232.1	ACE2	YLR131C	Activator of CUP1 Expression
NP_010502.3	ADR1	YDR216W	Alcohol Dehydrogenase II synthesis Regulator
NP_011444.1	AFT1	YGL071W	Activator of Ferrous Transport
NP_015122.1	AFT2	YPL202C	Activator of Fe (iron) Transcription
NP_013756.1	ARG80	YMR042W	ARGinine requiring
NP_013610.1	ARG81	YML099C	ARGinine requiring
NP_010709.1	ARO80	YDR421W	AROMATIC amino acid requiring
NP_015525.1	ARR1	YPR199C	ARSenicals Resistance
NP_012136.1	ASG1	YIL130W	Activator of Stress Genes
NP_012736.1	ASH1	YKL185W	Asymmetric Synthesis of HO
NP_014756.3	AZF1	YOR113W	Asparagine-rich Zinc-Finger
NP_013025.3	BAS1	YKR099W	BASal
NP_010711.3	CAD1	YDR423C	CADmium resistance
NP_014007.1	CAT8	YMR280C	CATABolite repression
NP_012594.1	CBF1	YJR060W	Centromere Binding Factor
NP_013891.1	CEP3	YMR168C	CENTromere Protein
NP_013199.1	CHA4	YLR098C	Catabolism of Hydroxy Amino acids
NP_014671.1	CIN5	YOR028C	Chromosome INSTability
NP_011056.1	COM2	YER130C	Cousin of Msn2
NP_014371.1	CRZ1	YNL027W	Calcineurin-Responsive Zinc finger
NP_012228.1	CST6	YIL036W	Chromosome STability
NP_011349.3	CUP2	YGL166W	
NP_015148.1	CUP9	YPL177C	
NP_012959.1	DAL80	YKR034W	Degradation of Allantoin
NP_012289.3	DAL81	YIR023W	Degradation of Allantoin
NP_011012.3	DOT6	YER088C	Disruptor Of Telomeric silencing
NP_013329.1	ECM22	YLR228C	ExtraCellular Mutant
NP_015304.1	ECM23	YPL021W	ExtraCellular Mutant
NP_009589.1	EDS1	YBR033W	Expression Dependent on Slt2
NP_009798.3	ERT1	YBR239C	Ethanol Regulated Transcription factor
NP_015429.1	FHL1	YPR104C	Fork Head-Like

**Arquivo suplementar S1. Continua...**

Código de acesso	Nome padrão	Nome sistemático	Nome completo
NP_012135.1	FKH1	YIL131C	ForK head Homolog
NP_014331.3	FKH2	YNL068C	ForK head Homolog
P40068.2	FLO8	YER109C	FLOcculation
NP_011260.1	FZF1	YGL254W	Five Zinc Fingers
NP_015076.1	GAL4	YPL248C	GALactose metabolism
NP_116632.1	GAT1	YFL021W	
NP_013113.1	GAT3	YLR013W	
NP_012278.3	GAT4	YIR013C	
NP_010907.3	GCN4	YEL009C	General Control Nonderepressible
NP_015250.1	GCR1	YPL075W	GlyColysis Regulation
NP_010381.1	GIS1	YDR096W	Glg1-2 Suppressor
NP_010958.3	GLN3	YER040W	GLutamiNe metabolism
NP_012432.1	GSM1	YJL103C	Glucose Starvation Modulator
NP_012425.1	GZF3	YJL110C	Gata Zinc Finger protein
NP_015333.1	HAA1	YPR008W	Homolog of Ace1 Activator
NP_116622.1	HAC1	YFL031W	Homologous to Atf/Creb1
NP_014552.1	HAL9	YOL089C	HALotolerance
NP_013357.1	HAP1	YLR256W	Heme Activator Protein
NP_011277.1	HAP2	YGL237C	Heme Activator Protein
NP_014043.1	HAP3	YBL021C	Heme Activator Protein
NP_012813.1	HAP4	YKL109W	Heme Activator Protein
NP_015003.1	HAP5	YOR358W	Heme Activator Protein
NP_009991.2	HCM1	YCR065W	High-Copy suppressor of Calmodulin
NP_010020.1	HMRA2	YCR096C	Hidden Mat Right A
NP_013895.1	HOT1	YMR172W	High-Osmolarity-induced Transcription
NP_011442.3	HSF1	YGL073W	Heat Shock transcription Factor
NP_012627.1	IME1	YJR094C	Inducer of MEiosis
NP_010408.1	INO2	YDR123C	INOsitol requiring
NP_014533.1	INO4	YOL108C	INOsitol requiring
NP_012893.3	IXR1	YKL032C	Intrastrand cross (X)-link Recognition
NP_009876.1	KAR4	YCL055W	KARyogamy
NP_013556.3	LEU3	YLR451W	LEUcine biosynthesis
NP_010317.3	LYS14	YDR034C	LYSine requiring
NP_013734.1	MAC1	YMR021C	Metal binding ACTivator
P10508.1	MAL63	MAL63	MALtose fermentation
NP_009868.3	MATALPHA2	YCR039C	MATing type protein ALPHA
NP_010227.1	MBP1	YDL056W	Mlul-box Binding Protein

**Arquivo suplementar S1.** Continua...

Código de acesso	Nome padrão	Nome sistemático	Nome completo
NP_013757.1	MCM1	YMR043W	MiniChromosome Maintenance
NP_015287.1	MET31	YPL038W	METHionine requiring
NP_010539.1	MET32	YDR253C	METHionine requiring
NP_014296.4	MET4	YNL103W	METHionine requiring
NP_011765.1	MGA1	YGR249W	
NP_011480.1	MIG1	YGL035C	Multicopy Inhibitor of GAL gene expression
NP_011306.1	MIG2	YGL209W	Multicopy Inhibitor of GAL gene expression
NP_010945.1	MIG3	YER028C	Multicopy Inhibitor of Growth
NP_010991.3	MOT2	YER068W	Modulator Of Transcription
NP_013786.1	MOT3	YMR070W	Modifier of Transcription
NP_014525.1	MSN1	YOL116W	Multicopy suppressor of SNF1 mutation
NP_013751.1	MSN2	YMR037C	Multicopy suppressor of SNF1 mutation
NP_012861.1	MSN4	YKL062W	Multicopy suppressor of SNF1 mutation
NP_013887.1	MSS11	YMR164C	Multicopy Suppressor of STA genes
NP_011992.1	NDT80	YHR124W	Non-DiTyrosine
NP_010282.3	NHP10	YDL002C	Non-Histone Protein
NP_015377.1	NHP6A	YPR052C	Non-Histone Protein
NP_009647.2	NHP6B	YBR089C-A	Non-Histone Protein
NP_010328.3	NRG1	YDR043C	Negative Regulator of Glucose-repressed genes
NP_009622.1	NRG2	YBR066C	Negative Regulator of Glucose-controlled genes
NP_009349.3	OAF1	YAL051W	Oleate-Activated transcription Factor
NP_011502.1	PDR1	YGL013C	Pleiotropic Drug Resistance
NP_009548.1	PDR3	YBL005W	Pleiotropic Drug Resistance
NP_013368.1	PDR8	YLR266C	Pleiotropic Drug Resistance
NP_012881.1	PHD1	YKL043W	PseudoHyphal Determinant
NP_010177.1	PHO2	YDL106C	PHOspate metabolism
NP_116692.1	PHO4	YFR034C	PHOspate metabolism
NP_015008.3	PIP2	YOR363C	Peroxisome Induction Pathway
NP_013114.1	PPR1	YLR014C	Pyrimidine Pathway Regulation
NP_012910.1	PUT3	YKL015W	Proline UTILization
NP_015512.1	PZF1	YPR186C	Putative Zinc Finger
NP_014183.1	RAP1	YNL216W	Repressor/Activator site binding Protein

**Arquivo suplementar S1.** Continua...

Código de acesso	Nome padrão	Nome sistemático	Nome completo
NP_015025.3	RDR1	YOR380W	Repressor of Drug Resistance
NP_014002.1	RDS1	YCR106W	Regulator of Drug Sensitivity
NP_015192.1	RDS2	YPL133C	Regulator of Drug Sensitivity
NP_009605.1	REB1	YBR049C	RNA polymerase I Enhancer Binding protein
NP_009825.4	REI1	YBR267W	REquired for Isotropic bud growth
NP_013277.1	RFX1	YLR176C	Regulatory Factor X
NP_013907.1	RGM1	YMR182C	
NP_012886.3	RGT1	YKL038W	Restores Glucose Transport
NP_011836.1	RIM101	YHL027W	Regulator of IME2
NP_015236.1	RLM1	YPL089C	Resistance to Lethality of MKK1P386 overexpression
NP_011558.1	RME1	YGR044C	Regulator of MEiosis
NP_015390.1	ROX1	YPR065W	Regulation by OXYgen
NP_011096.1	RPH1	YER169W	Regulator of PHR1
NP_010264.3	RPN4	YDL020C	Regulatory Particle Non-ATPase
NP_010589.3	RSC3	YDR303C	Remodel the Structure of Chromatin
NP_011923.2	RSC30	YHR056C	Remodel the Structure of Chromatin
NP_012661.3	RSF2	YJR127C	ReSPiration Factor
NP_014574.1	RTG1	YOL067C	ReTroGrade regulation
NP_009447.1	RTG3	YBL103C	ReTroGrade regulation
NP_014783.4	SFL1	YOR140W	Suppressor gene for FLOcculation
NP_013507.1	SFP1	YLR403W	Split Finger Protein
NP_012446.1	SIP4	YJL089W	SNF1-Interacting Protein
NP_012076.3	SKN7	YHR206W	Suppressor of Kre Null
NP_014232.1	SKO1	YNL167C	Suppressor of Kinase Overexpression
NP_009741.3	SMP1	YBR182C	Second MEF2-like Protein 1
NP_013729.1	SOK2	YMR016C	Suppressor Of Kinase
NP_011075.3	SPT15	YER148W	SuPpressor of Ty insertions
NP_009944.2	SRD1	YCR018C	
NP_010453.1	STB3	YDR169C	Sin Three Binding protein
NP_013732.1	STB4	YMR019W	Sin Three Binding protein
NP_012048.3	STB5	YHR178W	Sin Three Binding protein
NP_011952.1	STE12	YHR084W	STERile
NP_010751.4	STP1	YDR463W	Species-specific tRNA Processing
NP_011870.1	STP2	YHR006W	protein with similarity to Stp1p

**Arquivo suplementar S1.** Continua...

Código de acesso	Nome padrão	Nome sistemático	Nome completo
NP_013479.3	STP3	YLR375W	protein with similarity to Stp1p
NP_013479.3	STP4	YDL048C	protein with similarity to Stp1p
NP_010596.1	SUM1	YDR310C	SUppresor of Mar1-1
NP_011353.1	SUT1	YGL162W	Sterol UpTake
NP_015334.1	SUT2	YPR009W	Sterol UpTake
NP_011036.1	SWI4	YER111C	SWItching deficient
NP_010430.1	SWI5	YDR146C	SWItching deficient
NP_013283.1	SWI6	YLR182W	SWItching deficient
NP_015197.1	TBF1	YPL128C	TTAGGG repeat-Binding Factor
NP_009708.1	TBS1	YBR150C	ThiaBendazole Sensitive
NP_013630.1	TDA9	YML081W	Topoisomerase I Damage Affected
NP_014982.3	TEA1	YOR337W	Ty Enhancer Activator
NP_009639.3	TEC1	YBR083W	Transposon Enhancement Control
NP_009499.1	TOD6	YBL054W	Twin Of Dot6p
NP_011419.1	TOS8	YGL096W	Target Of Sbf
NP_014989.3	TYE7	YOR344C	Ty1-mediated Expression
NP_010111.1	UGA3	YDL170W	Utilization of GAba
NP_010493.1	UME6	YDR207C	Unscheduled Meiotic gene Expression
NP_010499.1	UPC2	YDR213W	UPtake Control
NP_010808.3	URC2	YDR520C	URacil Catabolism
NP_015094.1	USV1	YPL230W	Up in StarVation
NP_012208.1	VHR1	YIL056W	VHt1 Regulator
NP_013635.1	WAR1	YML076C	Weak Acid Resistance
NP_012165.1	XBP1	YIL101C	XhoI site-Binding Protein
NP_013707.1	YAP1	YML007W	Yeast AP-1
NP_013221.1	YAP3	YHL009C	Yeast AP-1
NP_012283.1	YAP5	YIR018W	Yeast AP-1
NP_010545.3	YAP6	YDR259C	Yeast homolog of AP-1
NP_014614.1	YAP7	YOL028C	Yeast AP-1
NP_013685.1	YOX1	YML027W	Yeast homeobOX
NP_014815.3	YRM1	YOR172W	Yeast Reveromycin resistance Modulator
NP_014805.3	YRR1	YOR162C	Yeast Reveromycin-A Resistant
NP_012479.1	ZAP1	YJL056C	Zinc-responsive Activator Protein
NP_116603.1	ZNF1	YFL052W	ZiNc Finger protein

**Arquivo complementar S2.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qPCR dos genes de *S. passalidarum*.

Gene	Primer F	Primer R
OLE1	AGGAACATCCAGGTGGACAAGC	TGAGCAGCGTTGGAGTGAGC
HSP104	TTGGTGATGCTGGTGTGGT	CGAACAACCTAGCGTTTGCC
HSP30	TGACAACACTGTTGACCCAGA	ATCAGTGGCAGTTGCAGGAA
ARG3	ACCTCGTCATTTGGTGAGCA	CCACACTGGTTTTACCCGAT
SOD1	TGAATCCGAACCAACCACCAT	TGAGGACCAGCAGAGGTACA
TPS1	CCTACTCCATGTCCCTGGGT	TCGTTCCCTGTTTCGTCTTCCG
ZWF1	GCCAGGCTACTTGGATGACGA	ACGATAGGAACACCATCCCAACG
GND2	CAATGACCCAACCGACGGTA	AAGGCATTGACAGCAGTCCA
TDH1	ACGGTTTCGGACGTATTGGT	TAAGCAGCGTAGTCGGTAGC
ADH1	TCCAGTCCCAGTTCCAAAGC	CTTCCAGGCGTGCAAATCAG
ADH7	GCAATCCAACCTGGGGTCCAT	ACCAACACGTTGACCGACTT
ACT1	ACGGTATCGTTTTCCAACCTGGG	GGTGTCTTCTGGGGCAACT
RBN18	TCACCAGGTCCAGACACAATAAG	GGTTAAGGTCTCGTTCGTTATCG

**Arquivo suplementar S3.** Ontologia gênica (GO) de processos biológicos das proteínas únicas de *S. cerevisiae* identificadas na análise de OrthoMCL, incluindo apenas os mais relevantes (frequência  $\geq 5\%$ ).

<b>GOID</b>	<b>GO term</b>	<b>Gene(s)</b>
6366	transcription from RNA polymerase II promoter	OAF1, GPB2, PAU8, PDR3, NRG2, MATALPHA1, NRG1, MET32, STP1, TOG1, PDR1, XRN1, STP2, RSC30, VHR1, FKH1, MGA2, SPT23, IXR1, RGT1, MSN4, CAF4, PDR8, MSN2, FKH2, CAF120, HAL9, RAT1, YRR1, YRM1, WTM2, WTM1, PIP2, MET31, UME1
42221	response to chemical	OAF1, GPB2, FLO1, PDR3, NRG2, FRM2, KIN82, RDS1, NRG1, MFA1, PDR1, MF(ALPHA)2, STF2, ASK10, CUP1-1, CUP1-2, VHR1, FKH1, MGA2, IXR1, MSN4, ATR1, MSN2, ASI1, ASI3, MSG5, MFA2, FPK1, ATG19, RGA1, YRR1, PIP2, GPB1, MF(ALPHA)1
6605	protein targeting	AST1, COS2, COS7, AST2, COS4, COS12, COS6, COS8, COS5, NUP100, COS9, COS3, NUP116, NUP53, COS1, COS10, ATG19, ATG34, WTM1
278	mitotic cell cycle	ALK2, MET32, GIC2, ALK1, XRN1, BUD9, CLB6, KEL2, GIC1, KEL1, FKH1, SIS2, BUD8, NUP53, CIK1, FKH2, GAC1, VIK1, CLB5
51726	regulation of cell cycle	MET32, GIC2, PCL10, XRN1, CLB6, KEL2, GIC1, KEL1, PCL7, FKH1, SIS2, NUP53, CIK1, FKH2, GAC1, UME1, CLB5
33043	regulation of organelle organization	OAF1, GIC2, SAC7, KEL2, GIC1, KEL1, FKH1, UTH1, PIF1, NUP53, CIK1, FKH2, GAC1, WTM2, WTM1, UME1, CLB5
6468	protein phosphorylation	ALK2, LRE1, KIN82, PKH1, ALK1, PCL10, CLB6, PCL7, PRK1, SDP1, HAL5, ARK1, MSG5, FPK1, PKH2, RAT1, CLB5
71554	cell wall organization or biogenesis	LRE1, FMP45, SAC7, PKH1, HLR1, SPS100, SDP1, IRC18, LOH1, CHS6, BCH2, UTH1, SKG1, MSG5, YGP1, PKH2, HPF1
51321	meiotic cell cycle	GPB2, PAU8, ALK2, FMP45, RAD51, DMC1, CLB6, SPS100, IRC18, LOH1, CIK1, GAC1, WTM2, WTM1, UME1, CLB5
51603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	COS2, COS7, COS4, COS12, COS6, COS8, DAS1, COS5, COS9, COS3, ASI1, ASI3, COS1, COS10, ATG19, GPB1

**Arquivo suplementar S3.** Continua...

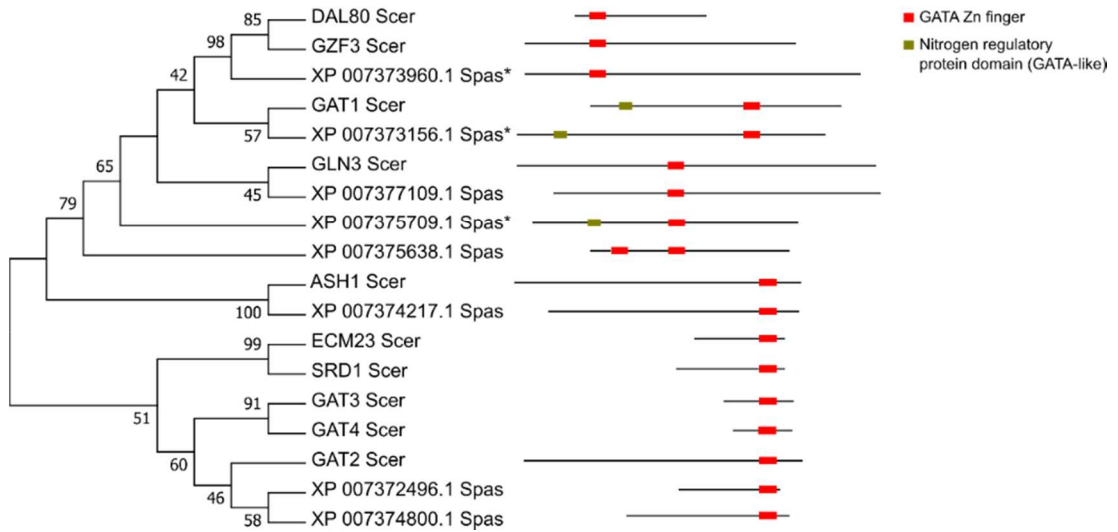
---

48285	organelle fission	ALK2, GIC2, RAD51, DMC1, ALK1, KEL2, GIC1, KEL1, MDV1, CAF4, NUP53, CIK1, GAC1, UME1, VIK1, CLB5
23052	signaling	GPB2, BIT2, RGA2, SAC7, MFA1, PKH1, MF(ALPHA)2, MDS3, SDP1, MSG5, MFA2, PKH2, RGA1, BAG7, GPB1, MF(ALPHA)1
6325	chromatin organization	OAF1, IOC3, RSC30, GIC1, FKH1, MGA2, SPT23, MSN4, UTH1, MSN2, FKH2, ESC8, WTM2, WTM1, UME1
6310	DNA recombination	AI1, AI2, AI4, AI5_ALPHA, SCE1, YRF1-1, RAD51, DMC1, YRF1-2, YRF1-3, YRF1-4, YRF1-5, PIF1, YRF1-6, YRF1-7

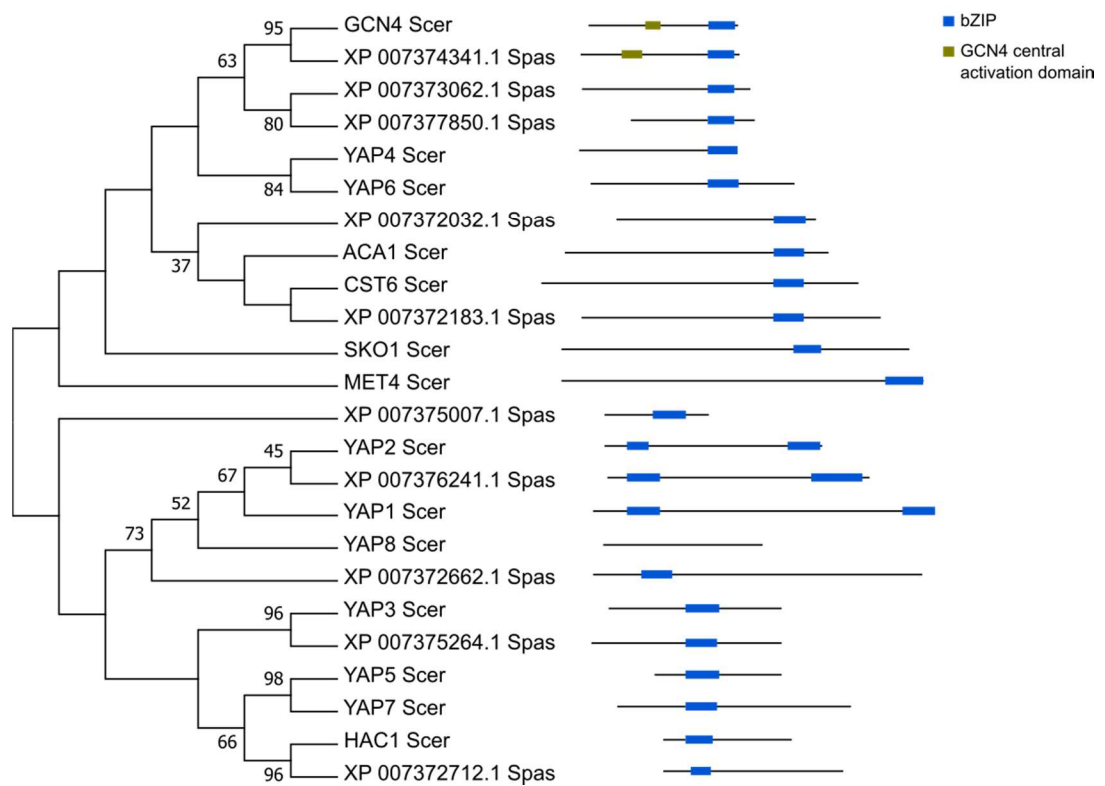
---

**Arquivo suplementar S4.** Árvores filogenéticas construídas para a identificação dos ortólogos putativos dos fatores de transcrição.

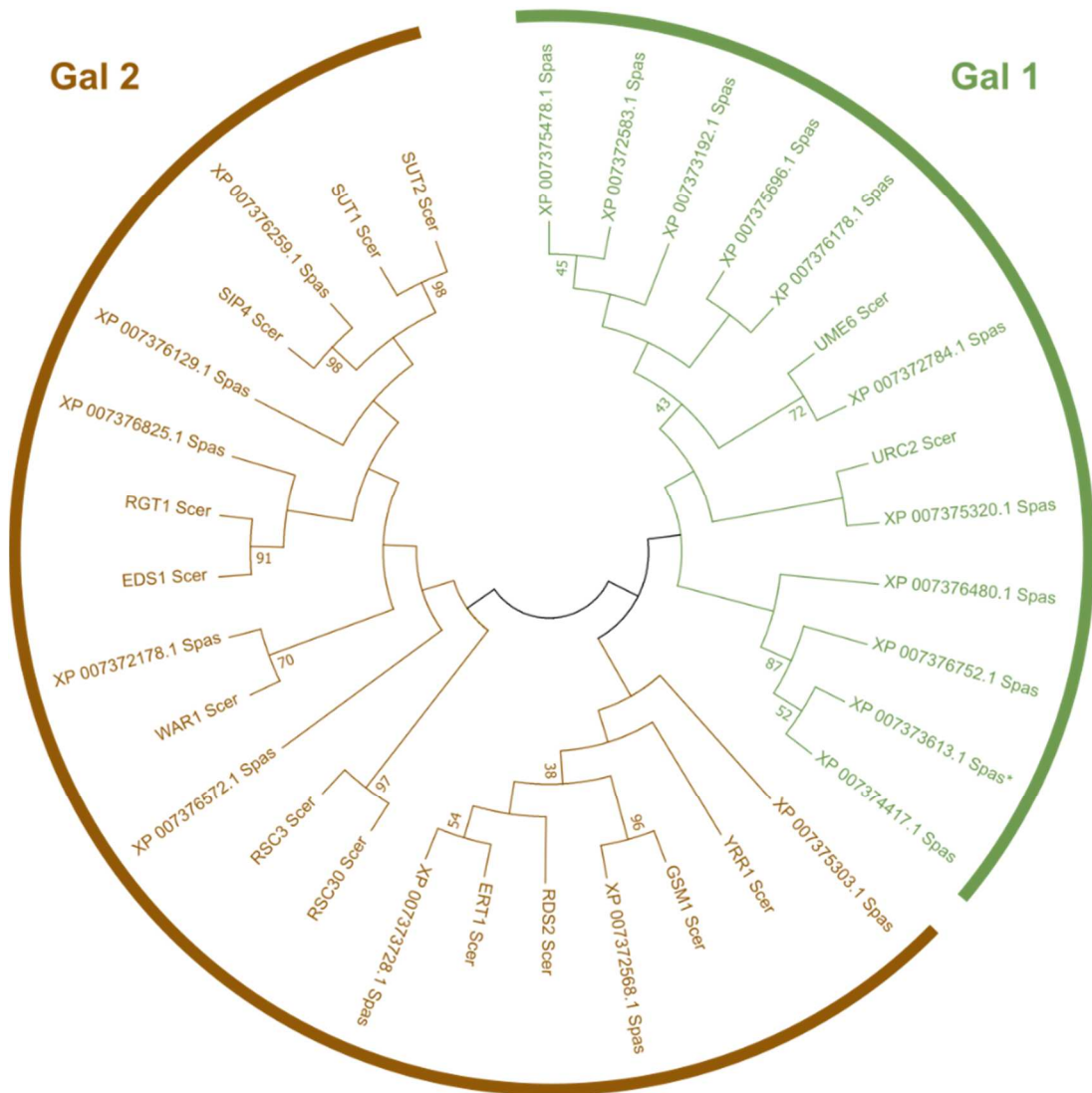
### GATA Zn-finger family tree



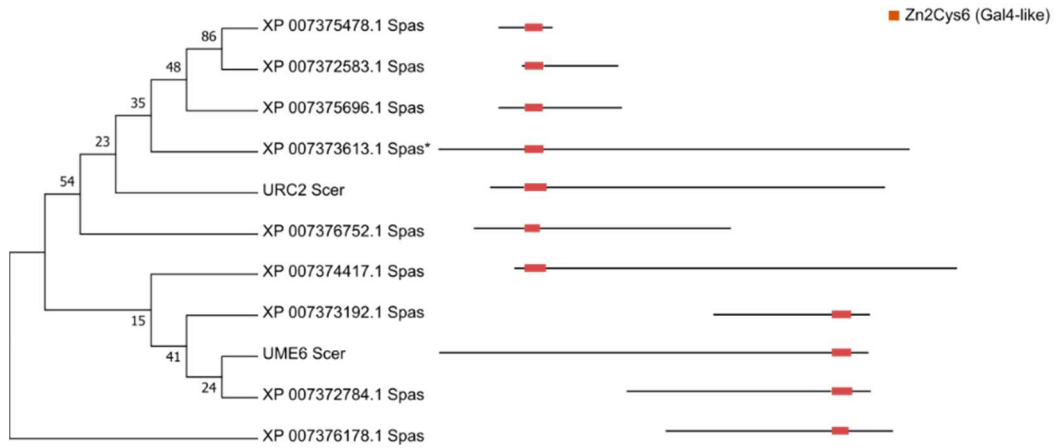
### bZIP family tree



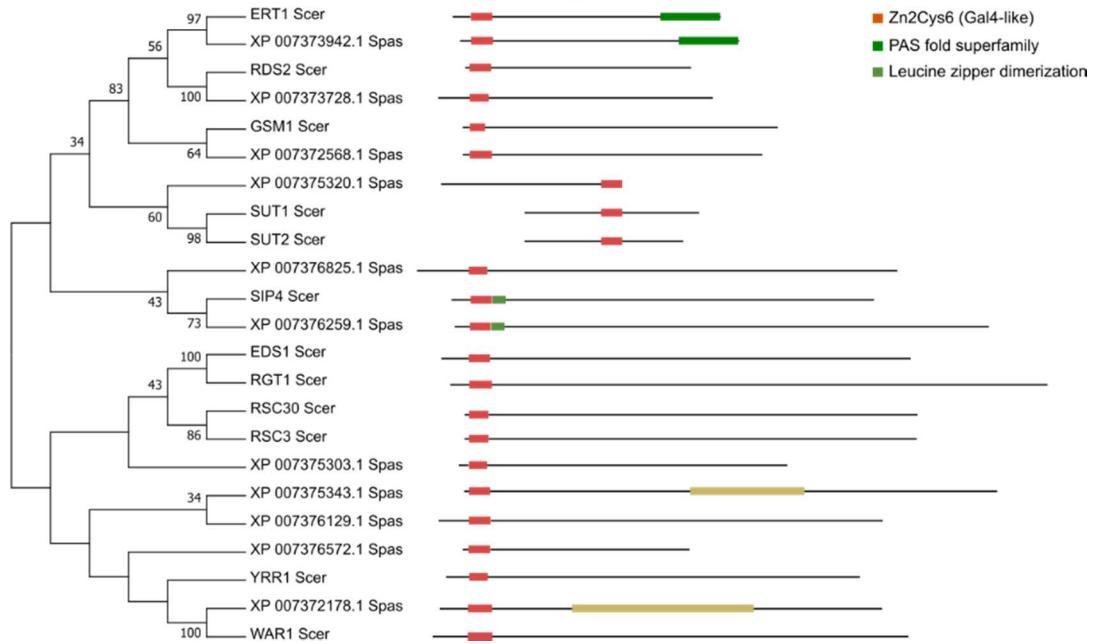
## Zn2Cys6 (Gal4-like)-only



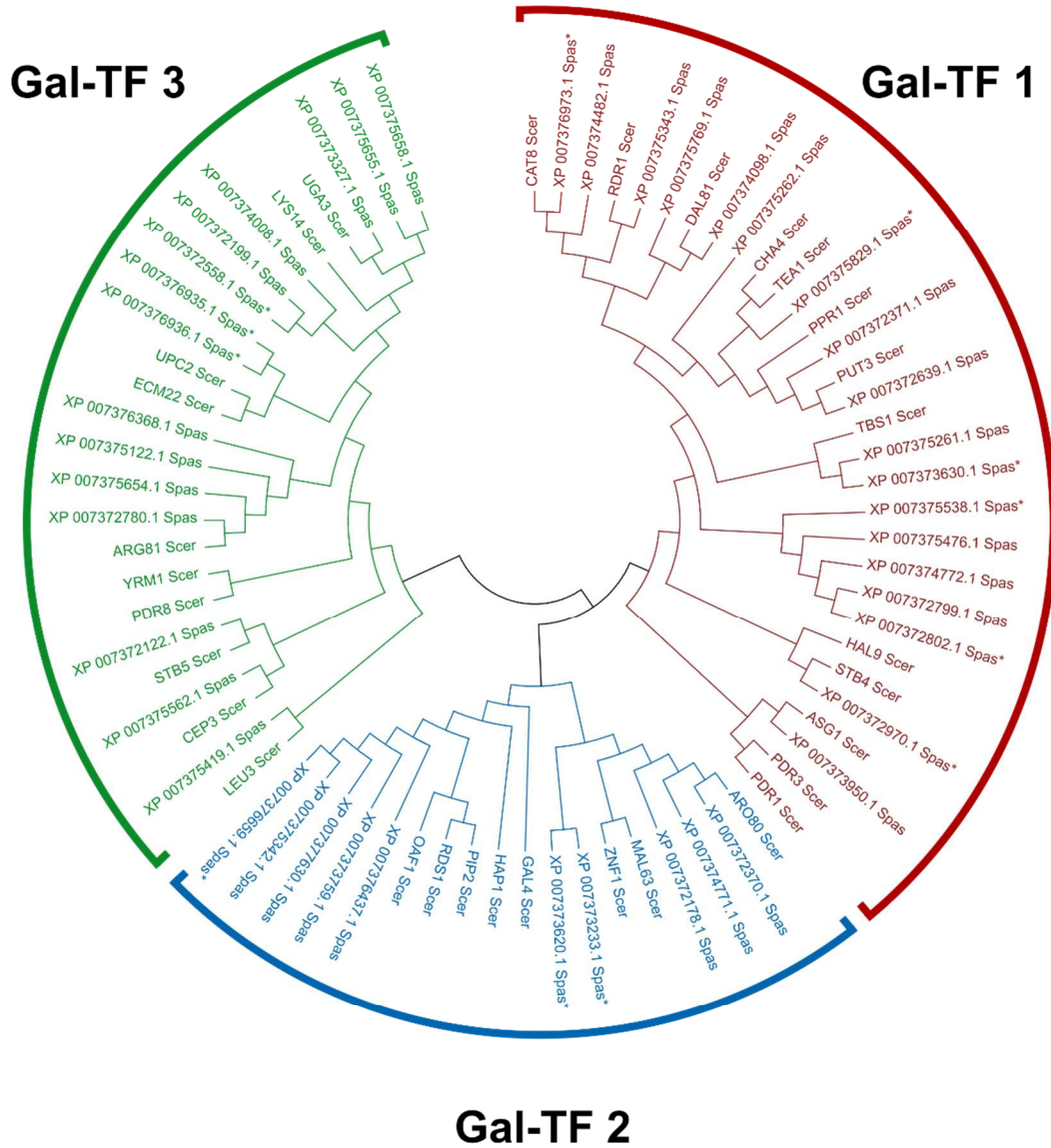
## Gal1



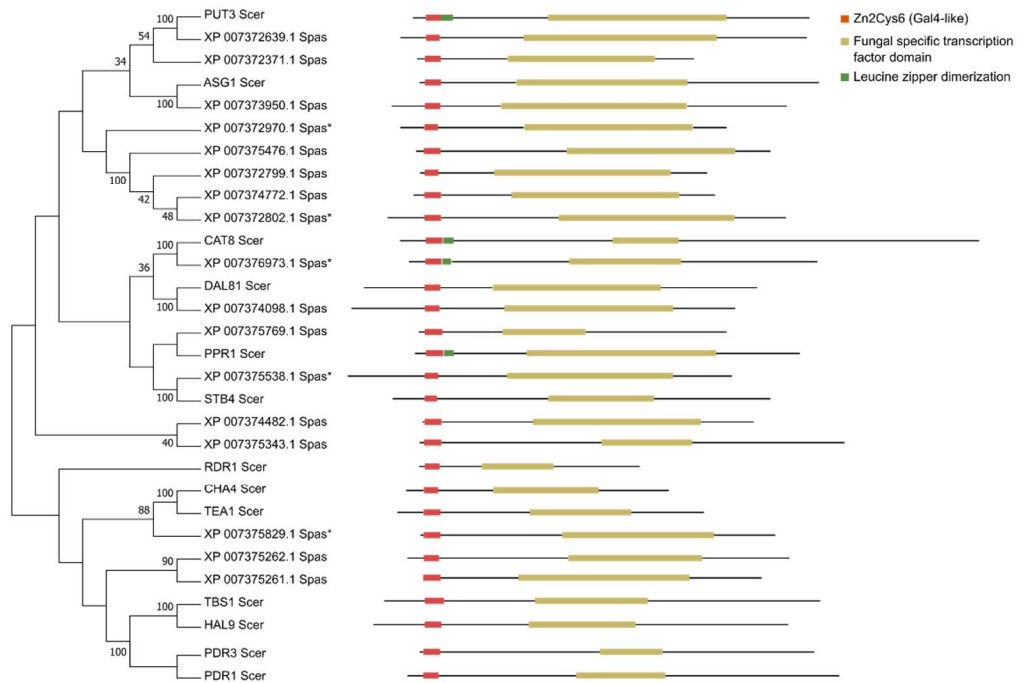
## Gal2



## Zn2Cys6 (Gal4-like) + fungal transactivator domain

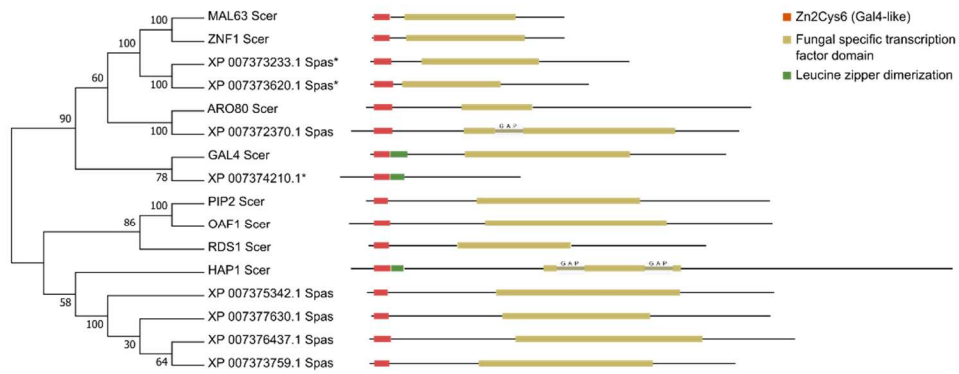


## Gal-TF 1

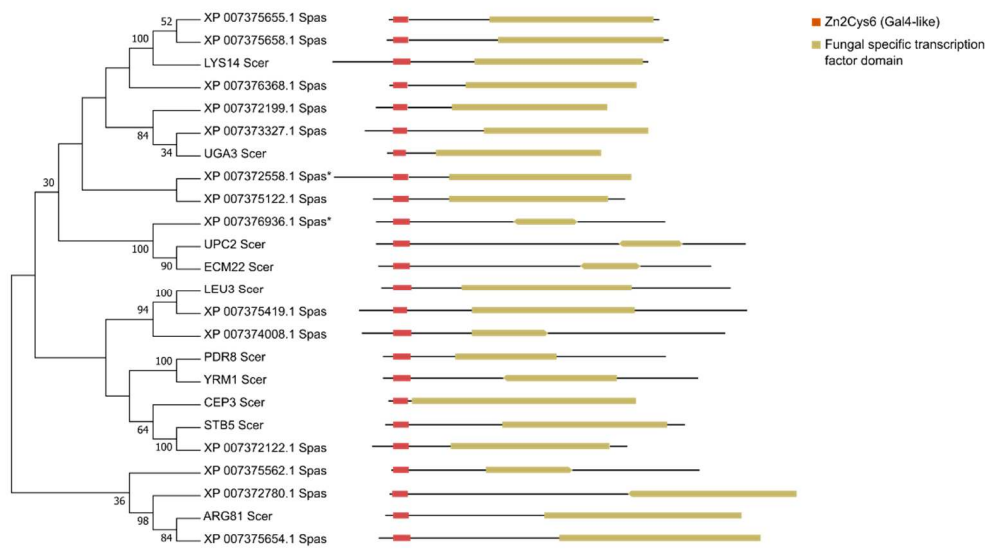


Arquivo suplementar S4. Continua...

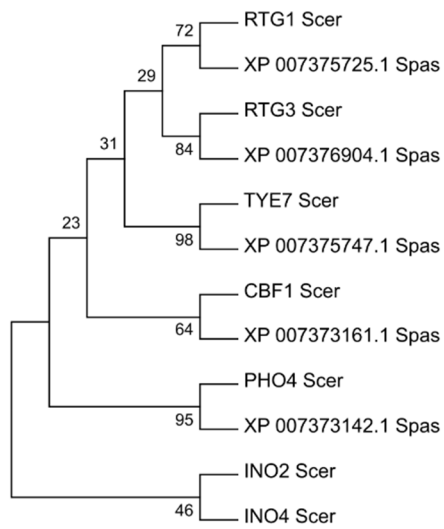
### Gal-TF 2



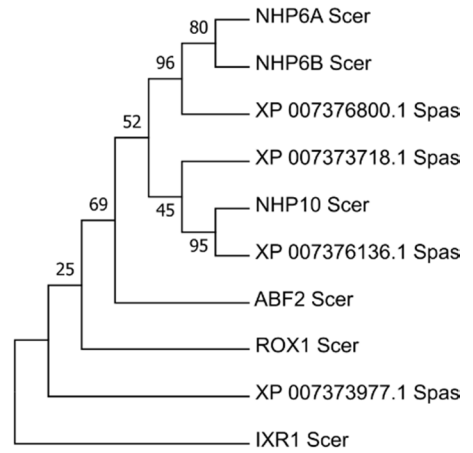
### Gal-TF 3



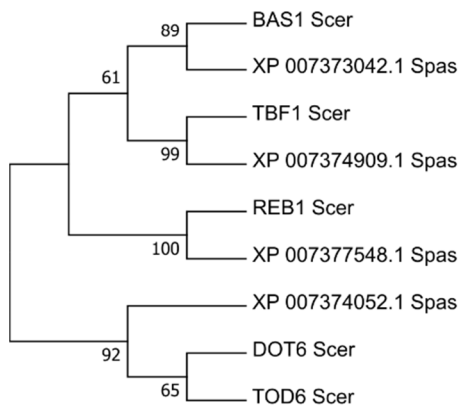
### HLH family tree



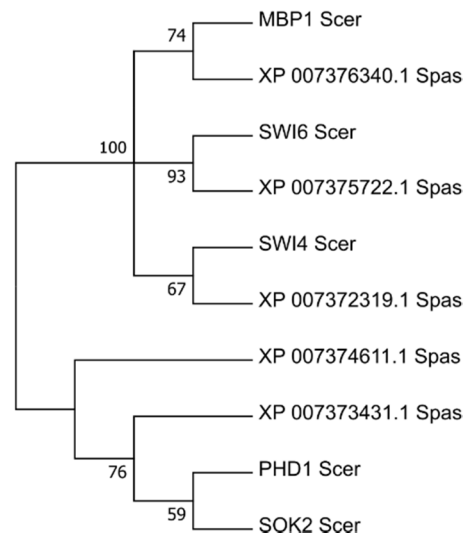
### HMG family tree



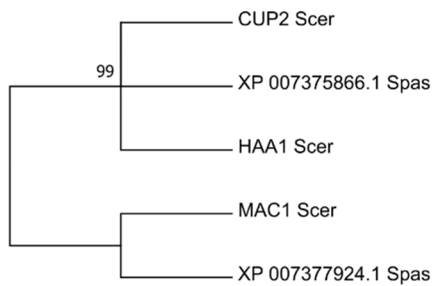
### Myb-like family tree



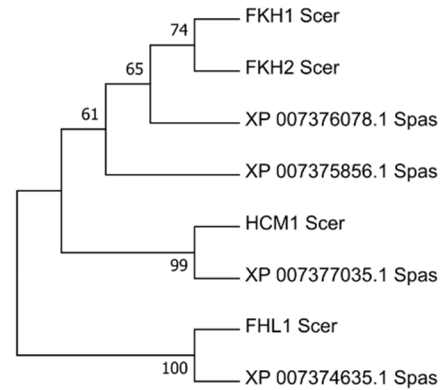
### KiIA family tree



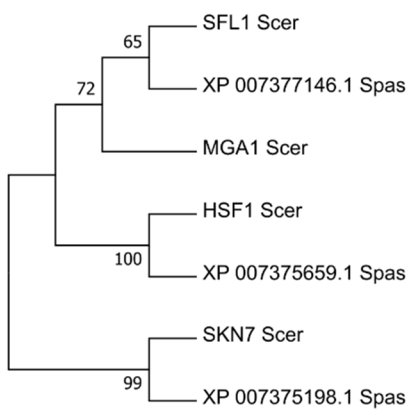
### Cooper-fist family tree



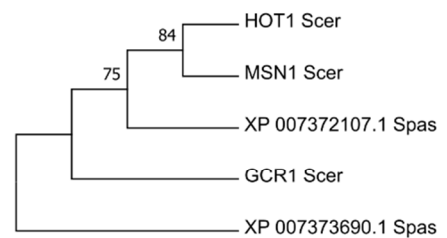
### Forkhead HNF3 family tree



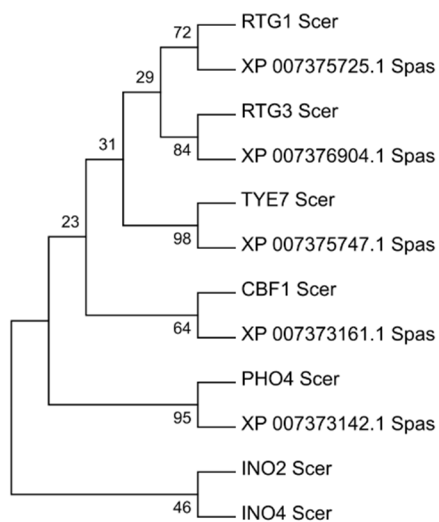
### HSF family tree



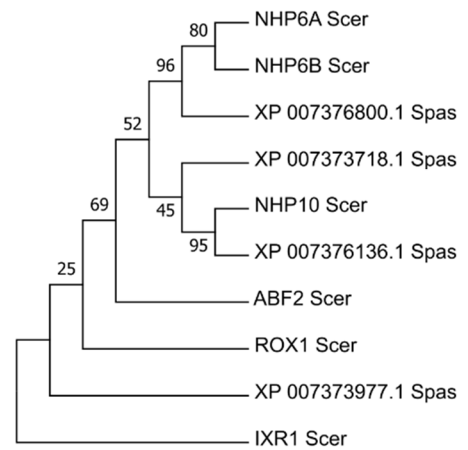
### GCR family tree



### HLH family tree



### HMG family tree



**Arquivo suplementar S5.** Tabela de ortólogos identificados em *S. passalidarum* com parâmetros estimados. Identificadores assinalados com asterisco (\*) indicam sequências manualmente corrigidas.

Classe	<i>S. cerevisiae</i>				<i>S. passalidarum</i>		
	Nome	Tamanho e pI	Domínios	Identificador	Tamanho e pI	Domínios	Identidade (%)
Abdominal-A Superfamily	Pho2p	559 (4.89)	Homeobox domain (53-183)	XP_007377166.1 *	541 (5.25)	Homeobox domain (9-62)	30.31
	Yox1p	385 (10.33)	Homeobox domain (126-267)	XP_007377909.1 *	385 (9.96)	Homeobox domain (110-223)	33.70
Cooper-fist	Cup2p	225 (7.97)	Cooper-fist DBD (2-39)	XP_007375866.1 *	603 (6.30)	Cooper-fist DBD (2-39)	27.92
	Haa1p	694 (8.84)	Cooper-fist DBD (2-39)				28.87
	Mac1p	417 (6.70)	Cooper-fist DBD (2-40)	XP_007377924.1 *	473 (7.12)	Cooper-fist DBD (2-39)	25.18
Forkhead HNF3	Fhl1p	936 (5.61)	Forkhead (FH) domain (18-739) DNA binding site (490-525)	XP_007374635.1	1186 (8.79)	Forkhead (FH) domain (67-752) DNA binding site (700-735)	23.12
	Fkh1p	484 (8.80)	Forkhead (FH) domain (1-484) DNA binding site (335-375)	XP_007376078.1	661 (9.43)	Forkhead (FH) domain (26-352) DNA binding site (278-316)	35.26
	Fkh2p	862 (9.32)	Forkhead (FH) domain (1-610) DNA binding site (372-412)				27.20
	Hcm1p	564 (6.57)	Forkhead (FH) domain (20-564) DNA binding site (142-179)	XP_007377035.1	596 (7.38)	Forkhead (FH) domain (166-248) DNA binding site (200-238)	30.10
GCR1 Superfamily	Hot1p	719 (7.77)	GCR1_C (617-694)	XP_007372107.1 *	541 (6.99)	GCR1_C (438-515)	24.62

	Msn1p	382 (6.23)	GCR1_C (278-365) TALPID3 superfamily (58-206)				23.45
HLH Superfamily	Cbf1p	351 (4.93)	HLH domain (220-272)	XP_007373161.1 *	228 (7.05)	HLH domain (130-178)	33.43
	Pho4p	312 (7.25)	HLH domain (251-307)	XP_007373142.1	508 (8.46)	HLH domain (444-502)	30.03
	Rtg1p	177 (5.89)	HLH domain (21-102)	XP_007375725.1 *	277 (5.79)	HLH domain (121-206)	26.76
	Rtg3p	486 (5.53)	HLH domain (284-349)	XP_007376904.1	556 (4.83)	HLH domain (385-469)	25.80
	Tye7p	291 (4.75)	HLH domain (181-266)	XP_007375747.1	326 (8.58)	HLH domain (233-302)	34.49
HMG Box	Nhp6Ap	93 (9.76)	HMG domain (17-93)	XP_007376800.1	93 (9.73)	HMG domain (3-89)	70.10
	Nhp6Bp	99 (9.99)	HMG domain (1-99)				66.67
	Nhp10p	203 (7.64)	HMG domain (24-203)	XP_007376136.1	277 (4.80)	HMG domain (121-204) Cell surface glycoprotein (183-256)	34.86
	Rox1p	368 (9.88)	MATA HMG-box (9-88)	XP_007373977.1	434 (8.96)	MATA HMG-box (132-209) HMG domain (68-194)	22.94
Homeobox HOX	Mata2p	210 (9.48)	HOX domain (135-188)	XP_007375266.1	174 (5.99)	HOX domain (103-164)	34.22
	Hmra2p	119 (9.94)	HOX domain (44-97)				26.29
Homeobox KN	Cup9p	306 (9.37)	Homeobox KN (180-219)	XP_007377929.1	266 (9.65)	Homeobox KN (213-252)	25.97
	Tos8p	276 (10.23)	Homeobox KN (212-251)				29.73
HSF Superfamily	Hsf1p	833 (5.20)	HSF-type DBD (165-453)	XP_007375659.1 *	627 (5.25)	HSF-type DBD (199-306)	26.80

	Mga1p	456 (9.49)	HSF-type DBD (1-156)	XP_007377146.1 *	545 (9.58)	HSF-type DBD (16-124) RhoGEF superfamily (254-439)	29.23
	Sfl1p	766 (8.79)	HSF-type DBD (53-381) Atrophin-1 superfamily (540-722)				29.58
HSF Superfamily	Skn7p	622 (6.56)	HSF-type DBD (75-350) REC superfamily (379-488)	XP_007375198.1	606 (6.97)	HSF-type DBD (35-136) REC superfamily (456-566)	31.67
KilA Superfamily	Mbp1p	833 (9.27)	KilA-N domain (19-93) Ankyrin repeats (344-441) Ankyrin repeats (391-549) SMC-N superfamily (640-825)	XP_007376340.1	853 (5.39)	KilA-N domain (26-89) Ankyrin repeats (366-539)	33.10
	Phd1p	366 (9.01)	KilA-N domain (209-285)	XP_007373431.1 *	487 (9.33)	KilA-N domain (201-284)	29.91
	Sok2p	785 (8.57)	KilA-N domain (437-509)				25.52
	Swi4p	1094 (8.81)	KilA-N domain (52-123) Ankyrin repeats (517-663) SMC-N superfamily (814-1092)	XP_007372319.1	840 (5.84)	KilA-N domain (27-89) Ankyrin repeats (325-475)	30.84
	Swi6p	803 (4.74)	Ankyrin repeats (314-490) Vps51 superfamily (543-614)	XP_007375722.1	674 (4.93)	KilA-N domain (61-139) Ankyrin repeats (259-404) Ankyrin repeats (384-430)	28.00
MADS Box	Arg80p	177 (5.02)	MADS superfamily (1-177)	XP_007377916.1	266 (5.14)	MADS superfamily (53-132)	27.21
	Mcm1p	284 (4.97)	MADS superfamily (18-284)				36.76

MYB Superfamily	Bas1p	811 (8.11)	SANT domain (17-585)	XP_007373042.1	724 (5.98)	SANT domain (45-218)	32.13
	Dot6p	670 (9.59)	Myb DBD (75-125)	XP_007374052.1 *	626 (9.25)	Myb DBD (62-116) BLLF1 superfamily (191-447)	28.75
	Tod6p	525 (9.37)	SANT domain (77-120)				29.47
	Reb1p	810 (4.96)	SANT domain (202-701) SANT domain (691-719)	XP_007377548.1	594 (6.23)	SANT domain (249-435)	23.20
	Tbf1p	562 (6.29)	TRF domain (29-300) SANT domain (410-462)	XP_007374909.1	691 (4.76)	DnaJ domain (3-164) TRF domain (227-495) SANT domain (585-637)	27.16
bZIP Family	Aca1p	489 (8.46)	bZIP-ATF2 (386-442)	XP_007372032.1 *	390 (5.70)	bZIP-ATF2 (294-353)	24.81
	Cst6p	588 (7.75)	bZIP-ATF2 (428-485)				20.73
	Gcn4p	281 (5.23)	bZIP-GCN4 (226-278) GCN4 activation domain (106-134)	XP_007374341.1	301 (4.64)	bZIP-GCN4 (242-295) GCN4 activation domain (77-115)	34.56
	Hac1p	238 (4.97)	bZIP-HAC1 (41-91)	XP_007372712.1	335 (5.11)	bZIP-HAC1 (51-88)	26.50
	Met4p	672 (5.48)	bZIP predict (612-641)	XP_007373062.1 *	313 (5.25)	bZIP predict (143-197)	17.51
	Sko1p	647 (9.33)	bZIP-ATF2 (431-482) HRA domain (196-228)	XP_007372183.1	556 (9.22)	bZIP-ATF2 (354-412) HRA domain (144-174) NAM-associated superfamily (274-383)	31.06
	Yap1p	650 (4.80)	bZIP-YAP (65-126) PAP1 domain (587-647)	XP_007376241.1 *	487 (4.94)	bZIP-YAP (38-99) PAP1 domain (209-479)	34.04
	Yap2p	409 (6.68)	bZIP-YAP (44-87) PAP1 domain (355-406)				27.84

bZIP Family	Yap3p	330 (4.97)	bZIP-YAP (145-207)	XP_007375264.1	355 (4.91)	bZIP-YAP (175-233)	28.01
	Yap4p	295 (9.67)	bZIP (239-294)	XP_007375007.1	196 (8.02)	bZIP-YAP (91-152)	29.5
	Yap6p	383 (8.67)	bZIP (220-277)				20.7
GATA Zn finger	Ash1p	588 (9.93)	ZnF_GATA (494-548)	XP_007374217.1	510 (9.45)	ZnF_GATA (427-460)	32.41
	Dal80p	269 (8.81)	GAT1 domain (1-269)	XP_007373960.1 *	681 (9.68)	ZnF_GATA (130-180)	16.08
	Gzf3p	551 (9.34)	GAT1 domain (4-551)				28.20
	Gat1p	514 (8.87)	GAT1 domain (1-499) Unknown function domain (60-87)	XP_007373156.1 *	628 (9.07)	ZnF_GATA (460-510) Unknown function domain (75-102)	30.42
	Gln3p	730 (9.55)	GAT1 domain (56-715)	XP_007377109.1	667 (9.12)	ZnF_GATA (233-284)	28.47
C2H2 Zn Finger	Ace2p	770 (8.47)	C2H2 Zn finger (176-683)	XP_007373529.1 *	698 (7.95)	C2H2 Zn finger (567-591) C2H2 Zn finger (599-619) C2H2 Zn finger (404-642)	31.19
	Swi5p	709 (8.86)	C2H2 Zn finger (124-630)				29.70
	Azf1p	914 (6.92)	C2H2 Zn finger (342-768)	XP_007373956.1 *	975 (9.44)	C2H2 Zn finger (815-840) C2H2 Zn finger (787-812) C2H2 Zn finger (774-795) C2H2 Zn finger (843-870)	29.63
	Com2p	443 (5.52)	C2H2 Zn finger (1-443)	XP_007373528.1 *	912 (5.43)	C2H2 Zn finger (870-892) C2H2 Zn finger (855-881) C2H2 Zn finger (841-864)	16.72

	Crz1p	675 (5.75)	C2H2 Zn finger (136-614) Recombinase domain (595-653)	XP_007376458.1	651 (5.25)	C2H2 Zn finger (513-535) C2H2 Zn finger (527-552)	29.72
	Gis1p	894 (7.28)	C2H2 Zn finger (828-851) C2H2 Zn finger (842-868) JmjC domain (191-307) JmjN domain (11-52)	XP_007372795.1	634 (8.03)	JmjC domain (224-340) ePHD domain (436-538) JmjN domain (21-61) none DNA binding domain!	22.57
	Rph1p	796 (9.19)	C2H2 Zn finger (507-759) C2H2 Zn finger (723-749) JmjC domain (222-338) JmjN domain (13-54)				35.64
	Met31p	177 (9.42)	C2H2 Zn finger (75-166)	XP_007374272.1 *	435 (6.17)	C2H2 Zn finger (318-340)	19.12
	Met32p	191 (9.92)	C2H2 Zn finger (41-191)				21.92
	Mig1p	504 (9.80)	C2H2 Zn finger (5-413)	XP_007374203.1 XP_007375537.1	543 (9.71) 457 (10.17)	C2H2 Zn finger (32-124) C2H2 Zn finger (1-79)	<i>Percent Identity Matrix 1</i>
C2H2 Zn Finger	Mig2p	382 (9.74)	C2H2 Zn finger (1-381)				
	Mig3p	394 (9.96)	C2H2 Zn finger (1-394)				
	Msn2p	705 (6.02)	C2H2 Zn finger (127-595) C2H2 Zn finger (677-699) C2H2 Zn finger (662-688) C2H2 Zn finger (648-671)	XP_007375611.1 *	608 (8.63)	C2H2 Zn finger (560-582) C2H2 Zn finger (545-571) C2H2 Zn finger (531-552)	25.77
	Msn4p	630 (6.73)	C2H2 Zn finger (57-622)				27.87
	Nrg1p	231 (8.99)	C2H2 Zn finger (21-229)	XP_007377954.1	245 (9.99)	C2H2 Zn finger (173-243)	30.00
	Nrg2p	220 (9.87)	C2H2 Zn finger (72-220)				29.14

	Pzf1p	429 (8.85)	C2H2 Zn finger (46-427)	XP_007374853.1	433 (7.35)	C2H2 Zn finger (29-162)	38.68
	Rgm1p	211 (9.63)	C2H2 Zn finger (19-44) C2H2 Zn finger (36-61)	XP_007373566.1 *	556 (9.12)	C2H2 Zn finger (52-136)	15.46
	Usv1p	391 (9.73)	C2H2 Zn finger (11-389)	XP_007373566.1 *	556 (9.12)	C2H2 Zn finger (52-136)	27.66
	Rim101p	630 (6.68)	C2H2 Zn finger (41-576)	XP_007375900.1	711 (5.87)	C2H2 Zn finger (281-303)	29.74
	Rme1p	300 (6.67)	C2H2 Zn finger (178-205 ) C2H2 Zn finger (206-234) C2H2 Zn finger (256-286)	XP_007372690.1	528 (6.72)	C2H2 Zn finger (423-501)	19.93
	Rpn4p	531 (5.20)	C2H2 Zn finger (450-502)	XP_007372428.1	481 (4.52)	C2H2 Zn finger (395-452)	29.22
C2H2 Zn Finger	Rsf2p	1380 (8.34)	C2H2 Zn finger (137-569) C2H2 Zn finger (450-990)	XP_007375859.1	1109 (6.67)	C2H2 Zn finger (29-415) Fungal_TF_MHR (538-731)	28.69
	Tda9p	1251 (7.61)	C2H2 Zn finger (29-235) C2H2 Zn finger (360-869)	XP_007375859.1 XP_007376359.1	1109 (6.67) 397 (6.50)	C2H2 Zn finger (29-415) Fungal_TF_MHR (538-731)	32.66
	Sfp1p	683 (6.20)	SFP1 (43-683)			SFP1 (64-397)	35.15
	Stp1p	519 (7.25)	C2H2 Zn finger (160-182)	XP_007376386.1	509 (6.91)	C2H2 Zn finger (353-373)	<i>Percent Identity Matrix 2</i>
	Stp2p	541 (5.98)	C2H2 Zn finger (204-226)	XP_007375766.1	548 (6.68)	C2H2 Zn finger (228-250)	<i>Percent Identity Matrix 2</i>
	Stp3p	343 (9.37)	C2H2 Zn finger (137-295)	XP_007374979.1 *	399 (9.46)	C2H2 Zn finger (242-290)	29.62

Zn2-Cys6 Cluster (GAL4-like)	Arg81p	880 (6.50)	Zn(2)-Cys(6) domain (19-58) Fungal trans 2 (395-878)	XP 007375654.1	944 (8.88)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (36-78) Fungal trans 2 (449-942)	38.37
	Aro80p	950 (5.92)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (19-64) Fungal TF MHR (238-412)	XP 007372370.1	991 (6.35)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (57-103) Fungal TF MHR (305-832)	37.82
	Asg1p	986 (5.97)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (15-56) Fungal TF MHR (241-662)	XP 007373950.1	973 (5.83)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (85-122) Fungal TF MHR (271-727)	33.19
	Cat8p	1433 (9.11)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (65-106) ZIP Cat8 (108-134) Fungal trans (530-693)	XP 007376973.1 *	1006 (6.31)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (41-81) ZIP Cat8 (83-105) Fungal trans (394-670)	25.38
	Cha4p	648 (6.56)	Zn(2)-Cys(6) domain (43-78) Fungal trans (214-473)	XP 007375829.1 *	877 (6.64)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (8-49) Fungal TF MHR (349-723)	23.31
	Tea1p	759 (6.05)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (64-105) Fungal trans (329-579)				36.95
	Dal81p	970 (8.23)	Zn(2)-Cys(6) domain (149-188) Fungal TF MHR (319-732)	XP 007374098.1	948 (7.19)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (182-218) Fungal TF MHR (380-795)	33.90
	Ecm22p	814 (6.22)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (39-80) Fungal TF MHR (508-638)	XP 007376936.1 *	711 (5.78)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (44-85) Fungal TF MHR (355-495)	40.44
	Upc2p	913 (5.67)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (46-87) Fungal TF MHR (612-753)				37.71

Zn2-Cys6 Cluster (GAL4-like)	Ert1p	529 (8.75)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (35-77) PAS superfamily (411-527)	XP 007373942.1	548 (7.63)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (24-67) PAS superfamily (431-547) PAT1 superfamily (101-266)	38.72
	Gsm1p	618 (8.01)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (14-44)	XP 007372568.1	585 (8.39)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (14-57)	32.85
	Gal4p	881 (6.79)	Zn(2)-Cys(6) domain (9-47) Gal4 dimer domain (50-93) Fungal TF MHR (236-643)	XP 007374210.1*	446 (4.93)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (84-122) ZIP_Gal4 (125-160)	13.59
	Hap1p	1483 (7.25)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (59-99) ZIP_Hap1 (99-130) Fungal TF MHR (476-814)	XP 007377630.1	982 (6.41)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (7-43) Fungal TF MHR (353-686)	23.18
	Hal9p	1030 (7.28)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (131-171) Fungal trans (390-653)	XP 007375261.1	835 (5.46)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (1-42) Fungal TF MHR (235-655)	<i>Percent Identity Matrix 3</i>
	Tbs1p	1076 (5.46)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (101-149) Fungal trans (372-650)	XP 007375262.1	940 (5.42)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (41-79) Fungal TF MHR (398-727)	
	Leu3p	886 (5.78)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (31-76) Fungal TF MHR (201-620)	XP 007375419.1	961 (7.60)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (86-120) Fungal TF MHR (282-683)	38.65
	Lys14p	790 (6.50)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (153-195) Fungal TF MHR (359-773)	XP 007375655.1	672 (7.47)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (13-50) Fungal TF MHR (251-655)	27.02
				XP 007375658.1	697 (5.99)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (18-55)	26.62

---

Fungal TF MHR (276-683)

---

						<i>Percent Identity Matrix 4</i>
Mal63p	473 (7.96)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (4-43) Fungal TF MHR (79-353)	XP 007373233.1 *	638 (6.20)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (10-53) Fungal TF MHR (127-416)	
Znf1p	465 (6.71)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (3-43) Fungal TF MHR (74-366)	XP 007373620.1 *	533 (6.09)	Zn(2)-Cys(6) domain (11-48) Fungal TF MHR (74-316)	
Oaf1p	1047 (6.44)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (61- 101) Fungal TF MHR (338-784)	XP 007375342.1	1012 (6.82)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (17-51) Fungal TF MHR (317-780)	28.15
Put3p	979 (5.23)	Zn(2)-Cys(6) domain (32-68) ZIP_Put3 (70-100) Fungal TF MHR (335-773)	XP 007372639.1	1004 (5.77)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (65-98) Fungal TF MHR (307-782)	38.36
Rds2p	446 (7.44)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (11- 53)	XP 007373728.1	539 (8.61)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (62-99)	47.79
Sip4p	829 (6.11)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (40- 82) ZIP_Sip4 (85-102)	XP 007376259.1	1047 (7.64)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (33-73)	27.91
Stb4p	945 (7.31)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (78- 118) Fungal trans (397-657)	XP 007375538.1 *	953 (7.17)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (191-225) Fungal TF MHR (385-803)	28.28
Stb5p	743 (8.73)	Zn(2)-Cys(6) domain (20-58) Fungal TF MHR (293-699)	XP 007372122.1	635 (8.50)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (54-92) Fungal TF MHR (201-592)	36.32
Sut1p	299 (9.48)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (151- 175)	XP 007375320.1	350 (9.55)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (134-350)	25.43

---

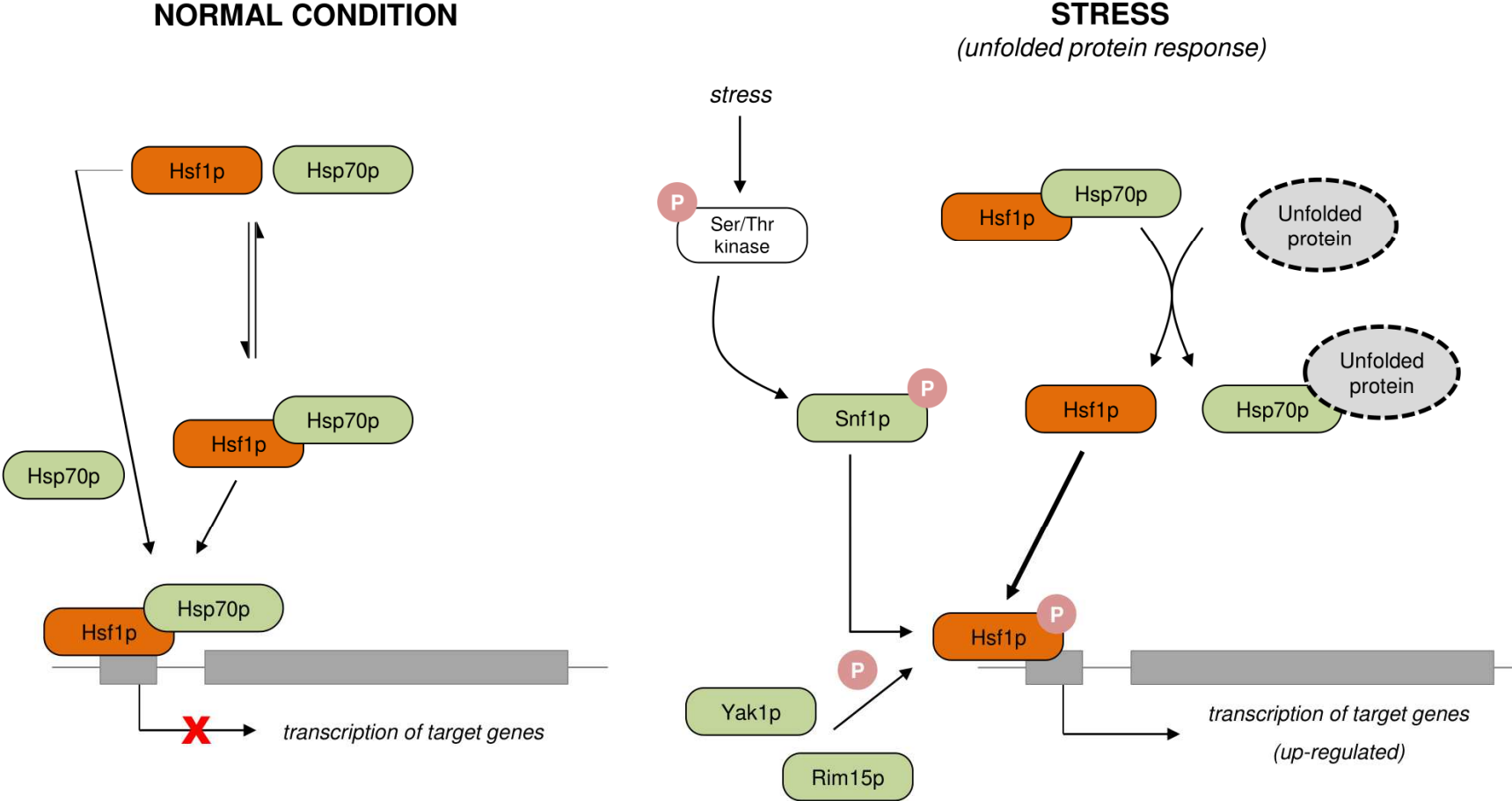
Zn<sup>2</sup>-Cys<sub>6</sub> Cluster  
(GAL4-like)

	Sut2p	268 (9.29)	--				25.31
Zn2-Cys6 Cluster (GAL4-like)	Uga3p	528 (6.27)	Zn(2)-Cys(6) domain (15-46) Fungal trans 2 (121-528)	XP_007373327.1	699 (6.32)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (71-105) Fungal trans 2 (294-699)	28.14
				XP_007372199.1	570 (5.41)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (44-78) Fungal trans 2 (188-570)	26.63
	Ume6p	836 (9.55)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (765-801)	XP_007372784.1	478 (9.61)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (399-439)	17.65
	War1p	944 (8.07)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (70-118) Slu7 domain (777-875)	XP_007372178.1	870 (7.13)	Gal4-like Zn(2)-Cys(6) domain (58-105) Fungal TF MHR (264-618)	30.08
LisH domain	Flo8p	799 (9.31)	LisH domain (77-101) BLLF1 superfamily (234-541)	XP_007377461.1	588 (8.74)	LisH domain (71-97)	26.54
	Mss11p	737 (8.41)	LisH domain (53-79)				28.29
CBFB-NFYA Superfamily	Hap2p	265 (8.63)	HAP2 domain (1-263)	XP_007372582.1	200 (6.26)	CBFB_NFYA domain (93-148)	38.30
H4 Superfamily	Hap3p	144 (4.78)	H4 superfamily (23-115)	XP_007376824.1	127 (4.92)	H4 superfamily (23-87)	48.05
BUR6 Superfamily	Hap5p	242 (4.50)	HAP5 domain (1-242)	XP_007375372.1	313 (4.99)	HAP5 domain (68-186)	30.46
MT-A70 Superfamily	Kar4p	335 (8.66)	MT-A70 (138-293)	XP_007373995.1	364 (9.40)	MT-A70 (120-299)	50.79
MOT2 Superfamily	Mot2p	587 (8.29)	MOT2 domain (9-560)	XP_007373899.1	613 (8.25)	MOT2 domain (1-440)	40.20
NDT80_PhoG Superfamily	Ndt80p	627 (6.19)	NDT80_PhoG (105-334)	XP_007373828.1	439 (5.93)	NDT80_PhoG (87-287)	29.11

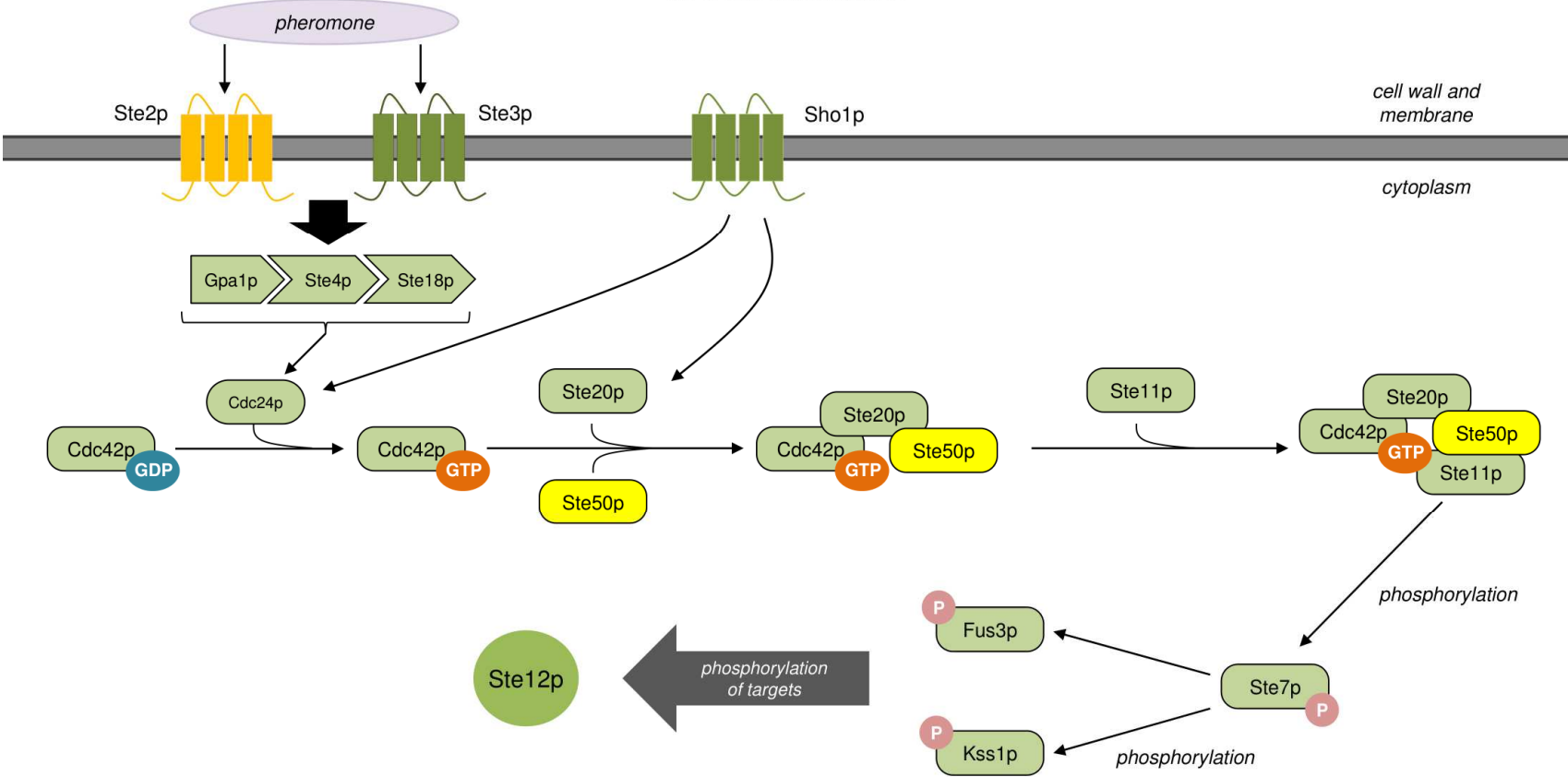
Rap1_RCT	Rap1p	827 (4.83)	BRCT_2 domain (127-207) Rap1 DBD (448-579) Rap1 RCT (727-824) Rap1 Myb-like (360-413)	XP_007374266.1	588 (4.83)	BRCT_2 domain (55-124) SANT superfamily (151-205; 242-331) Rap1_C (490-582)	21.00
RFX DNA binding Family	Rfx1p	771 (8.90)	RFX DBD (242-318) Atrophin 1 domain (21-182)	XP_007373642.1	833 (7.35)	RFX DBD (240-316) WASH 7 N-term (487-592)	28.95
TBP_TLF Superfamily	Spt15p	240 (9.39)	TATA-box binding domain (64-239)	XP_007372682.1	246 (9.05)	TATA-box binding domain (70-245)	75.59
STB3 Superfamily	Stb3p	513 (7.30)	Stb3 domain (43-120)	XP_007374361.1	549 (9.31)	Stb3 domain (119-197)	27.89
STE Superfamily	Ste12p	688 (5.41)	STE domain (58-167)	XP_007372614.1	525 (5.17)	STE domain (41-151)	37.95

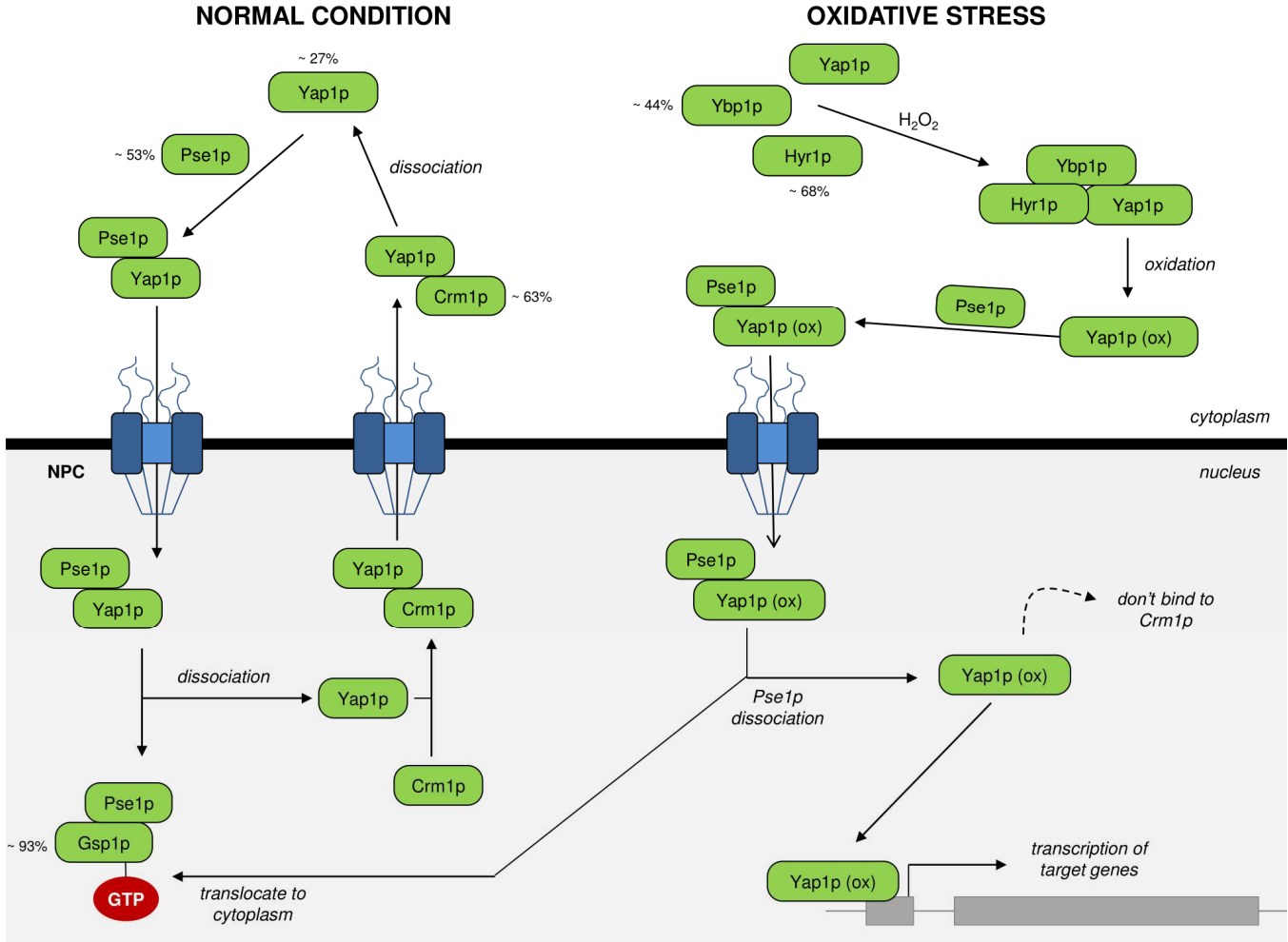


**Arquivo suplementar S7.** Vias de sinalização de *S. cerevisiae* reconstruídas em *S. passalidarum*. Verde, proteínas similares. Amarelo, proteínas com um parâmetro diferente. Vermelho, proteínas com 2+ parâmetros diferentes. Branco, proteína sem ortólogo identificado em *S. passalidarum*.

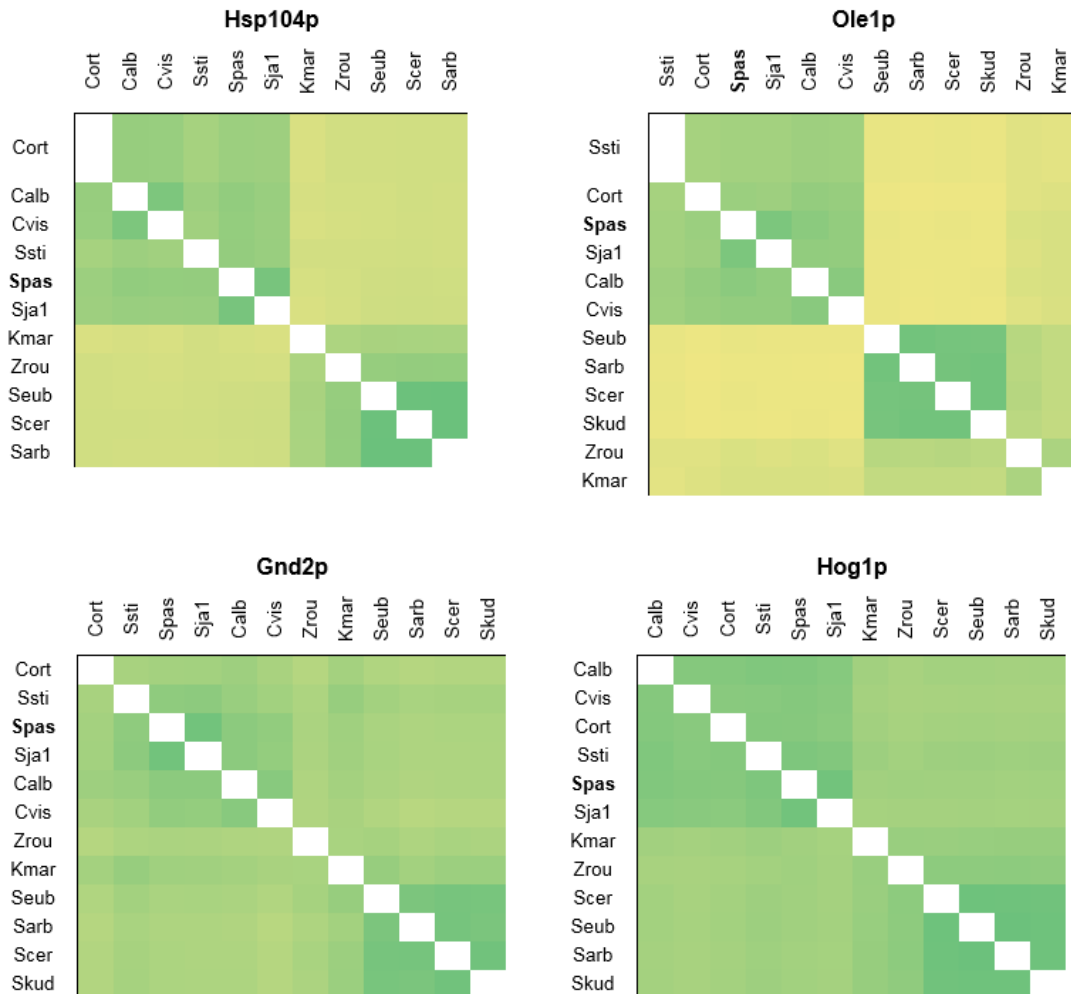


### MAPK PATHWAYS

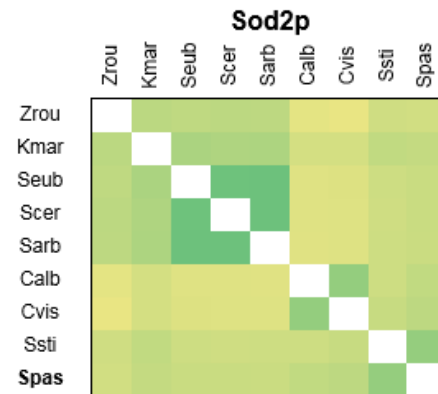
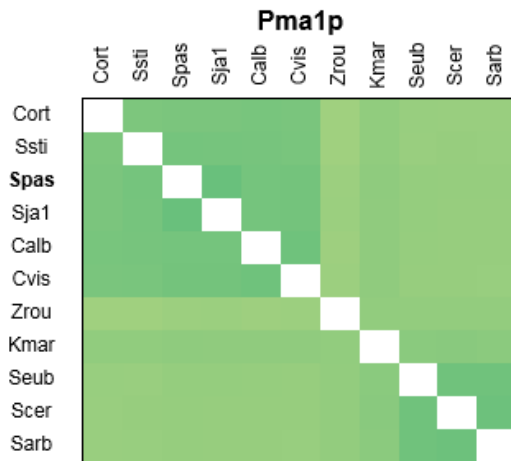
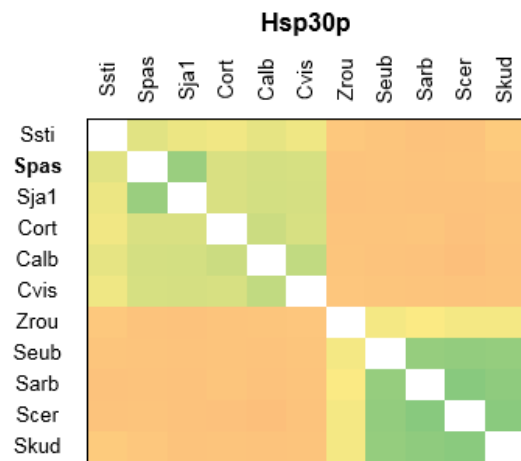
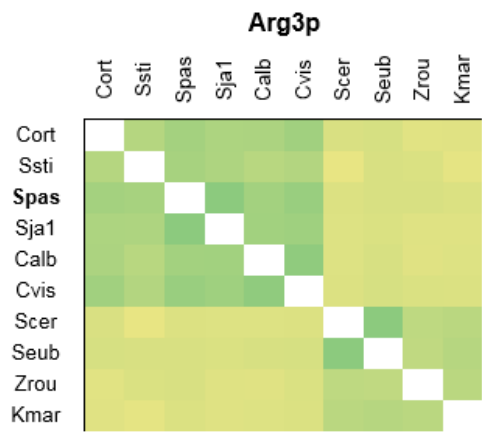




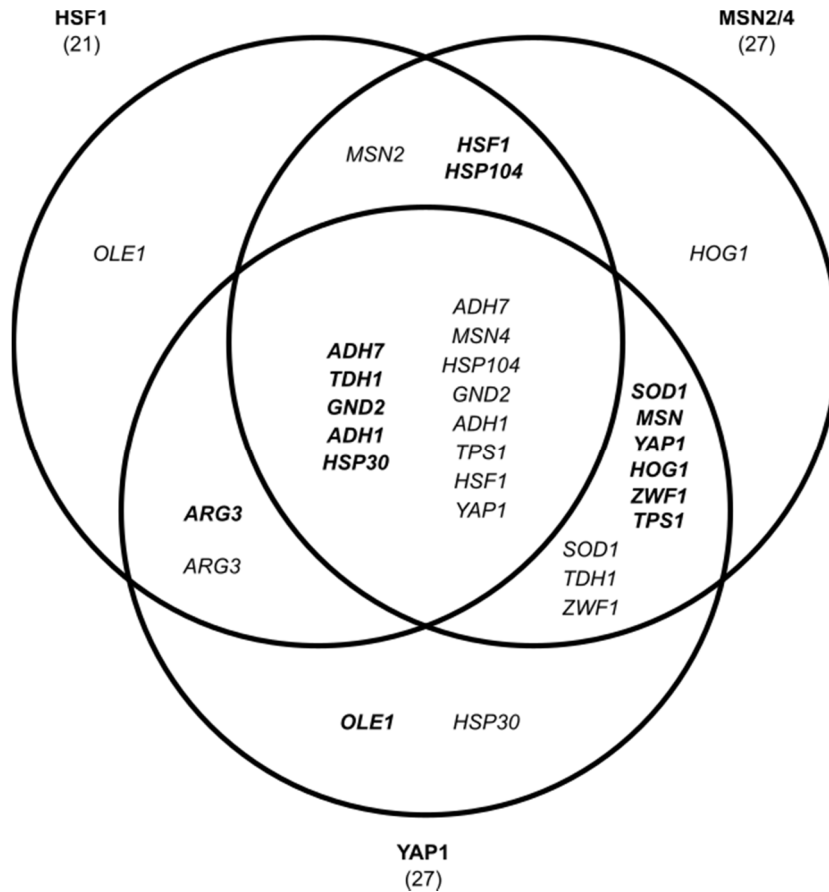
**Arquivo suplementar S8.** Matrizes de identidade de proteínas de *S. passalidarum*, *S. cerevisiae* e outras leveduras. Calb, *Candida albicans* SC5314; Sarb, *Saccharomyces arboricola* H6; Skud, *Saccharomyces kudriavzevii* IFO 1802; Cort, *Candida orthopsilosis* Co 90-125; Scer, *Saccharomyces cerevisiae*; Spas, *Spathaspora passalidarum*; Cvis, *Candida viswanathii*; Seub, *Saccharomyces eubayanus*; Ssti, *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054; Sja1, *Spathaspora* sp. JA1; Zrou, *Zygosaccharomyces rouxii*.



Arquivo suplementar S8. Continua...



**Arquivo suplementar S9.** Análise de cis-elementos dos promotores (1 kb adjacente ao sítio de iniciação ATG) dos genes de *S. passalidarum* (em negrito) e *S. cerevisiae* (grafia normal). As sequências foram utilizadas para identificação de domínios de ligação a Hsf1p, Msn2/4p e Yap1p.



## CONCLUSÕES GERAIS

A tolerância ao etanol é um importante aspecto fisiológico de leveduras para aplicação industrial. Mecanismos celulares diversos e inter-relacionados são essenciais para manutenção da viabilidade celular e capacidade fermentativa.

A deleção de *APJ1* em linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* revelou que esse gene não apresenta relação óbvia com a tolerância ao etanol. Além disso, a deleção pouco influencia a adaptação da levedura a outros parâmetros, como pH, temperatura, concentração de açúcar ou presença de ácido acético. Assim, o papel de *APJ1* na tolerância ao etanol permanece incerto. Estudos com outras linhagens de leveduras mais tolerantes ao etanol podem ser realizados para avaliação dos efeitos fisiológicos dessa mutação frente ao estresse por etanol.

Em contrapartida, a comparação de ortólogos entre *S. cerevisiae* e *S. passalidarum* revelou importantes aspectos moleculares que podem estar envolvidos na tolerância ao etanol de leveduras. Entre esses aspectos, a ampla divergência observada no inventário dos fatores de transcrição indica sistemas de controle da expressão gênica muito distintos. Isso pode levar a respostas adaptativas ao estresse mais ou menos eficientes, por meio da maior ou menor expressão de proteínas-chave responsivas ao etanol.

Evidencia-se, assim, que o controle dos mecanismos celulares de forma global é uma importante estratégia para a aquisição de tolerância ao etanol. Mudanças pontuais em alvos pouco relacionados a resposta ao etanol, como a deleção de *APJ1*, afetam pouco – ou nada – da resposta adaptativa celular. Entretanto, mudanças globais da expressão gênica levam a estados fisiológicos completamente diferentes, capazes de tolerar maiores (ou menores) concentrações de etanol.

## Apêndice A – Banco de dados de fatores de transcrição de *S. passalidarum*

Após a identificação dos fatores de transcrição, foi construída uma plataforma (ambiente local) para acesso e registro das proteínas anotadas de *S. passalidarum*, utilizando o banco de dados relacional MySQL e a linguagem de programação PHP, suportados pela estrutura nativa do Wordpress.


De modo geral, esse banco de dados agrupa informações como nome da proteína putativa, código de acesso no NCBI, domínios identificados, tamanho e pI, ortólogos em *S. cerevisiae*, além das sequências de nucleotídeos do gene e de aminoácidos da proteína, bem como a via de sinalização – quando construída (Figura 1).

MSN2/MSN4-like	
Accession code	XP_007375611.1 (Incomplete annotation)
DNA Binding Domain (superfamily)	C2H2 Zinc Finger (pfam)
Domains	C2H2 Zn Finger (531 - 554) C2H2 Zn Finger (560 - 582)
Length and molecular weight (isoelectric point)	608 aminoacids / 67.3 kDa / 8.63
Orthologs	<i>S. cerevisiae</i> (Msn2p) <i>S. cerevisiae</i> (Msn4p)
Protein sequence	MSSDCPPIFENSSATFFFTISGGNGVNNINEPFDITTYGDNQIDNLVGMNTPQNFSNMSY NTINATNTAAMPESLHINDEIFFNNYQLSNQFPGGVANKLNYDEESTGNLSSNSINNY SHNPSASASSQSSFSNSSTGVHSTFQTSATITPKVGSMPQFGNGPGKHGRQNSSSIPID

**Figura 1.** Informações básicas registradas do ortólogo de Msn2p e Msn4p em *S. passalidarum*.

Para procurar um fator de transcrição de interesse, é possível utilizar a ferramenta de busca com palavras-chave diversas, como domínio de ligação ao DNA, nome do ortólogo putativo ou o código de acesso do NCBI. Todas as proteínas que apresentarem correspondência serão apresentadas em uma nova página e basta ao usuário clicar no alvo de seu interesse para ter acesso às informações compiladas (Figura 2A e 2B).

**A)**



**B)**

**ZAP1-like**  
Pesquisar por: Accession code XP\_007373086.1 (Incomplete annotation) DNA Binding Domain (superfamily) C2H2 Zinc Finger (pfam) Domains Four in tandem C2H2 Zn Finger (500 - 632) Length and molecular weight (isoelectric point) 632 aminoacids / 71.8 kDa / 6.25...

**STP3/STP4-like**  
Pesquisar por: Accession code XP\_007374979.1 (Incomplete annotation) DNA Binding Domain (superfamily) C2H2 Zinc Finger (pfam) Domains C2H2 Zn Finger (242 - 290) Length and molecular weight (isoelectric point) 399 aminoacids / 45.1 kDa / 9.46 Orthologs S...

**STP2-like**  
Pesquisar por: Accession code XP\_007375766.1 DNA Binding Domain (superfamily) C2H2 Zinc Finger (pfam) Domains C2H2 Zn Finger (228 - 250) Length and molecular weight (isoelectric point) 548 aminoacids / 62.3 kDa / 6.68 Orthologs S. cerevisiae (Stp2p) Protein...

**STP1-like**  
Pesquisar por: Accession code XP\_007376386.1 DNA Binding Domain (superfamily) C2H2 Zinc Finger (pfam) Domains C2H2 Zn Finger (353 - 373) Length and molecular weight (isoelectric point) 509 aminoacids / 57.7 kDa / 6.91 Orthologs S. cerevisiae (Stp1p) Protein...

**Figura 2.** Ferramenta de buscas do banco de dados. A) Página principal com “search box”. B) Resultado da busca por “C2H2”, referência ao domínio C2H2 zinc-finger, retornando todos os resultados que contenham esse domínio.

Para registrar novas proteínas, basta acessar um painel de administração user-friendly e preencher as informações necessárias (Figura 3). Após a publicação desse novo registro, ele se torna acessível para novas

buscas. Se necessário editar ou modificar alguma informação, o mesmo painel de administração pode ser utilizado.

The image displays a user interface for protein record management, organized into five horizontal rows. Each row contains two main input fields: a 'Texto' (Text) field and a field for a specific protein attribute. The attributes are: 'Código de Acesso' (Access Code), 'Domínio de ligação a DNA' (DNA binding domain), 'Domínios (localização)' (Domains (localization)), 'Tamanho / Peso molecular (kDa) / pI' (Size / Molecular weight (kDa) / pI), and 'Ortologos' (Orthologs). Each 'Texto' field has a '+ Inserir Módulo(s)' (Insert Module(s)) button below it. The interface includes a vertical sidebar on the left with icons for menu, search, and close, and a horizontal header bar at the top with similar icons.

**Figura 3.** Página de registro de proteína. O usuário precisa apenas clicar sobre a informação que deseja alterar (e.g., Código de acesso) e preencher as informações necessárias.

A construção desse banco de dados é um importante passo para a condução de novos estudos com essa levedura em nosso grupo de pesquisa, uma vez que diversas anotações do genoma estavam incompletas. Além disso, novos trabalhos que façam a identificação de proteínas e/ou genes podem utilizar esse banco para o registro dos dados.