

**MARINA GAROFALO LANA**

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VIAS DE REPRESSÃO POR GLICOSE EM**  
*Spathaspora passalidarum*

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

Orientador: Luciano Gomes Fietto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**  
**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L243i Lana, Marina Garofalo, 1994-  
2022 Identificação e análise de vias de repressão por glicose em  
*Spathaspora passalidarum* / Marina Garofalo Lana. – Viçosa,  
MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (45 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 38-43.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.309>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Expressão gênica - Análise. 2. Fermentação. 3.  
*Spathaspora passalidarum*. I. Fietto, Luciano Gomes, 1973-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 572.865

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

MARINA GAROFALO LANA

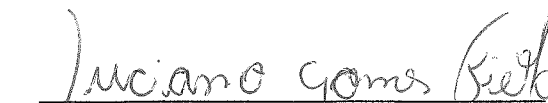
IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VIAS DE REPRESSÃO POR GLICOSE EM  
*Spathaspora passalidarum*

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

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Marina Garofalo Lana  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Luciano Gomes Fietto  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus queridos pais, Carmenia e Celio, que me amaram e apoiaram incondicionalmente em toda minha jornada, sempre garantindo que eu tivesse meios e forças para seguir em frente e nunca desistir. A todos os meus amigos, por me ajudarem a manter o pé no chão e a cabeça erguida.

À Universidade Federal de Viçosa ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de fazer parte do Programa de Pós -graduação em Bioquímica Aplicada. A todos os professores que contribuíram de forma inestimável com conhecimento e experiência para minha formação até aqui

Agradeço ao meu orientador, Dr. Luciano Gomes Fietto, e ao meu co-orientador, Dr. Alex Gazolla de Castro, por me instruírem e guiarem por águas até então desconhecidas com toda a dedicação. À Lílian, por facilitar minha adaptação a um novo ambiente, por todo empenho e paciência em me ensinar novas técnicas e formas de pensar, e por todo o apoio emocional que permitiu que eu me enxergasse de outra maneira. À Fernanda, por sempre se mostrar disposta e feliz em me ajudar, mesmo estando muito longe. À todas as pessoas do Laboratório de Biotecnologia Molecular, que sempre se mostram prestativos, atenciosos e disponíveis a auxiliar não só a mim, mas como qualquer pessoa. A todas as pessoas que aceitaram participar como membros da banca e adicionar sua sabedoria a este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro

A todos, os meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

## RESUMO

LANA, Marina Garofalo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022.  
**Identificação e análise de vias de repressão por glicose em *Spathaspora passalidarum*.**  
Orientador: Luciano Gomes Fietto.

A levedura *Spathaspora passalidarum* apresenta os melhores rendimentos em produção de etanol utilizando xilose como substrato, quando comparada a outras leveduras fermentadoras. Entretanto, a presença de glicose no meio impede o transporte e utilização desta pentose, aumentando o tempo de fermentação. Esse fenômeno de inibição da utilização de outras fontes de carbono é conhecido como repressão por glicose, e em *Saccharomyces cerevisiae*, é o resultado da ação de duas vias clássicas de sinalização: Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig1. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar tais vias em *S. passalidarum* e avaliar a influência destas no controle de genes do metabolismo de xilose. Análises *in silico* mostraram que *S. passalidarum* possui a maioria dos componentes das vias clássicas; no entanto, há baixa conservação das sequências em relação à *S. cerevisiae*. As análises de *cis*-elementos das regiões promotoras dos genes de enzimas envolvidas no metabolismo de xilose revelaram a presença de motivos de ligação para três fatores de transcrição pertencentes às vias clássicas – Rgt1, Adr1 e Mig1. Análises de expressão do gene XYL1.1 e do consumo de xilose na presença de glicose e/ou do análogo 2-deoxi-glicose sugerem a ocorrência de dois mecanismos de inibição do metabolismo de xilose em *S. passalidarum*: um a nível do transporte e outro a nível de repressão da expressão gênica. Em conjunto, nossos resultados apontam, em *S. passalidarum*, os elementos que provavelmente inibem o metabolismo de xilose na presença de glicose, o que será imprescindível para os futuros trabalhos de melhoramento da capacidade fermentativa desta levedura.

Palavras-chave: Expressão gênica – Análise. Fermentação. *Spathaspora passalidarum*

## ABSTRACT

LANA, Marina Garofalo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022.  
**Identification and analysis of glucose repressed pathways in *Spathaspora passalidarum*.**  
Adviser: Luciano Gomes Fietto.

The yeast *Spathaspora passalidarum* shows the best yields regarding ethanol production utilizing xylose as substrate, when compared to other fermenting yeasts. However, the presence of glucose in the medium prevents the transport and utilization of this pentose, increasing the time of fermentation. This phenomenon of inhibition of the utilization of other carbon sources is known as glucose repression, and in *Saccharomyces cerevisiae*, is the result of the action of two classic signaling pathways: Snf3/Rgt2 and Snf1/Mig1. The aim of the present work was to characterize these pathways in *S. passalidarum* and evaluate their influence in the control of xylose metabolism genes. *In silico* analyses showed that *S. passalidarum* has most of the components of the classic pathways; nevertheless, there is low sequence conservation in comparison to *S. cerevisiae*. The analyses of *cis*-elements of promoting regions of the genes of enzymes involved in the metabolism of xylose showed the presence of binding motifs for three transcription factors belonging to the classic pathways – Rgt1, Adr1 and Mig1. The analysis of the *XYL1.1* gene expression and of xylose consumption in the presence of glucose and/or the analogue 2-deoxyglucose suggest the occurrence of two inhibition mechanisms of xylose metabolism in *S. passalidarum*: one at the level of transport and the other at the level of gene expression. Together, our results point out, in *S. passalidarum*, the elements that probably inhibit xylose metabolism in the presence of glucose, which will be essential for future improvement of this yeast fermentative capacity

Keywords: Genetic expression – Analysis. Fermentation. *Spathaspora passalidarum*

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1.1. Bioetanol: aspectos econômicos e ambientais .....	8
1.2. Etanol de primeira e segunda geração .....	8
1.3. Repressão e co-fermentação .....	9
1.4. Via Snf3/Rgt2 .....	10
1.4.1. <i>Snf3p/Rgt2p</i> .....	10
1.4.2. <i>Rgt1p</i> .....	11
1.4.3. <i>Mth1p e Std1p</i> .....	11
1.4.4. <i>Mecanismo de sinalização</i> .....	11
1.5. Via Snf1/Mig1 .....	13
1.5.1. <i>Snf1p</i> .....	13
1.5.2. <i>Mig1p</i> .....	13
1.5.3. <i>Hexocinase 2</i> .....	13
1.5.4. <i>Adr1</i> .....	14
1.5.5. <i>Mecanismo de sinalização</i> .....	14
1.6. Interseção das vias Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig1.....	15
1.7. Aspectos da regulação gênica .....	16
1.8. Transporte e utilização de D-glicose e D-xilose .....	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral .....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
3. METODOLOGIA .....	19
3.1. Reconstrução das vias clássicas <i>in silico</i> .....	19
3.2. Busca por <i>cis</i> -elementos de fatores de transcrição das vias clássicas nos promotores dos genes do metabolismo de xilose .....	20
3.3. Ensaio de fermentação e co-fermentação de xilose, xilose e 2-deoxiglicose (2DG) e xilose e glicose.....	21
3.4. Análise da expressão gênica .....	21
3.5. Clonagem do promotor da xilose redutase ( <i>XYL 1.1.</i> ) de <i>S. passalidarum</i> no sistema pLacZi.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.3. <i>Spathaspora passalidarum</i> possui as vias clássicas de sinalização por glicose Snf3/Rgt2 e Mig1/Snf1 .....	23
4.4. <i>Cis</i> -elementos de fatores de transcrição das vias clássicas estão presentes nos promotores de genes envolvidos no metabolismo de xilose.....	28

4.5. Clonagem da região promotora do gene de <i>XYL1.1</i> de <i>S. passalidarum</i> em sistema pGEM®-T Easy Vector .....	29
4.6. 2-deoxiglicose impede a captação de xilose em <i>S. passalidarum</i> e não influencia no perfil de expressão de <i>XYL1.1</i> .....	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO .....	36
7. REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO 1 .....	44
ANEXO 2 .....	45

## **1. Revisão bibliográfica**

### **1.1. Bioetanol: aspectos econômicos e ambientais**

Combustíveis fósseis, além de serem recursos não renováveis, são um dos maiores contribuintes para a emissão de gases de efeito estufa, e seu uso é considerado a principal razão para a crise energética mundial e deterioração do clima (CHEN et al., 2021). Apenas no ano de 2019, 33.621,5 toneladas métricas de carbono foram lançadas à atmosfera (IEA, 2021). Em 2021, algumas metas foram estabelecidas pela COP26 a fim de mitigar os impactos das mudanças climáticas; dentre elas encontram-se manter o aumento da temperatura global em 1,5°C em relação a níveis pré-industriais. Para que essa meta seja possível, as emissões de carbono mundiais devem ser reduzidas, até 2030, em 45% em relação aos níveis de 2010 (ARORA; MISHRA, 2021).

Os biocombustíveis, especialmente o bioetanol, são substitutos promissores dos combustíveis fósseis para aliviar a crise climática e energética (CHEN et al., 2021). Segundo dados a IEA (International Energy Agency), a demanda mundial por biocombustíveis subiu cerca de 33,3% apenas de 2020 para 2021. Juntos, Brasil e Estados Unidos contribuem com 84% de toda a produção mundial de bioetanol, e no ano de 2019, a contribuição brasileira para essa porcentagem foi de 36 bilhões de litros de etanol (EPE, 2021).

Em 2017, o Ministério de Minas e Energia lançou o programa RenovaBio, cujo objetivo é atingir, em 2030, participação de 45% de energias renováveis na matriz energética do país. Dentre as medidas propostas, está o aumento da produção de etanol de primeira e segunda geração, atingindo a marca de 52,5 bilhões de litros produzidos a partir de 2023 (SOUSA et al., 2019). O bioetanol é, portanto, não apenas crucial para o avanço da economia brasileira, mas um importante recurso para o desenvolvimento de uma economia mundial sustentável.

### **1.2. Etanol de primeira e segunda geração**

O etanol de primeira geração é produzido, atualmente, a partir da fermentação de matérias-primas comestíveis hidrolisadas, como amido e açúcares simples, provenientes da cana de açúcar (matéria-prima majoritária no Brasil) ou milho (Estados Unidos) (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016). O etanol de segunda geração é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, podendo ser proveniente de resíduos agroindustriais, como bagaço de cana, ou outras fontes de material vegetal bruto, como grama, palha e madeira (HOU, 2012; ROBAK; BALCEREK, 2018).

Apesar dos benefícios ambientais, a produção de bioetanol de primeira geração, bem como de outros combustíveis, compete com a produção de alimentos por água e terras viáveis, além de contribuir para o esgotamento de recursos, como água, e degradação do solo (ROBAK; BALCEREK, 2018). A utilização da biomassa lignocelulósica possui diversas vantagens: as fontes estão geograficamente melhores distribuídas em relação aos combustíveis fósseis, o que aumentaria a segurança e diversidade energética; os materiais lignocelulósicos minimizam o conflito entre o uso da terra para produção de alimentos e para produção de biocombustível; a emissão líquida de gases estufa é baixa, o que reduz impactos ambientais (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006a; ROBAK; BALCEREK, 2018). No entanto, o aspecto mais significativo em aprimorar a economia geral da produção de bioetanol é maximizar o rendimento de etanol por unidade de biomassa: estima-se que o aproveitamento do bagaço e parte das palhas e pontas da cana-de açúcar eleve a produção de álcool em 30 a 40%, para uma mesma área plantada (HIMMEL et al., 1997; PACHECO, 2011).

As pentoses compreendem cerca de 25% dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, sendo a xilose a principal pentose presente nos hidrolisados (MARIANO et al., 2013). A fermentação de D-xilose é um fator essencial no uso eficiente de material vegetal para a produção de biocombustível (CADETE; ROSA, 2018). Atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada no processo de fermentação para produção de etanol; no entanto, não pode ser utilizada para fermentação de biomassa sem modificações genéticas, uma vez que não é capaz de fermentar xilose, devido à ausência de transportadores específicos e baixa expressão de genes envolvidos no metabolismo desta pentose (KIM et al., 2013).

A espécie de levedura *Spathaspora passalidarum*, isolada do intestino do besouro *Phrenapates bennetti* no Panamá, foi descrita por Nguyen et al., 2006. *Sp. passalidarum*, até o momento, é o melhor microrganismo fermentador de D-xilose: apresenta altos rendimentos de produção de etanol e rápido consumo de açúcar em meios ricos em xilose em condições anaeróbias ou com limitação de oxigênio (CADETE; ROSA, 2018). Em um trabalho realizado por Su et al (2014), o rendimento específico de etanol encontrado a partir da fermentação de xilose por *S. passalidarum* foi cerca de 0,48 gg<sup>-1</sup> - próximo ao máximo teórico de 0,51 gg<sup>-1</sup> -, e a fermentação de xilose rendeu maiores concentrações de etanol que a fermentação de glicose.

### 1.3. Repressão e co-fermentação

Quando hexoses facilmente fermentáveis como glicose e frutose são abundantes, seu consumo é favorecido e as células não expressam a capacidade de transporte e utilização de

outras fontes de carbono disponíveis, como maltose, galactose e sacarose. Esse padrão hierárquico é estabelecido por uma rede regulatória complexa de mecanismos que opera aos níveis de expressão gênica e pós-traducional (HORÁK, 2013). Tal incapacidade é denominada *repressão por glicose*, que impede a captação e/ou catabolismo de outros açúcares quando a glicose está presente (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014).

O parâmetro mais significativo em aprimorar a economia geral da produção de bioetanol é maximizar o rendimento de etanol por unidade de biomassa (HIMMEL et al., 1997). Para que a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica seja economicamente viável, é necessário que existam microrganismos capazes de metabolizar uma ampla variedade de açúcares em um mesmo meio (RODRUSSAMEE; SATTAYAWAT; YAMADA, 2018). Um dos maiores desafios na fermentação de açúcares individuais é a co-fermentação, ou seja, a fermentação simultânea de glicose e outros açúcares (KIM et al., 2013). O uso preferencial de glicose em relação a outros açúcares causa fermentação sequencial; isso aumenta o tempo necessário à fermentação e diminui a produção de etanol, uma vez que este inibe o crescimento e a viabilidade celular, sendo um dos principais fatores de estresse para leveduras durante o processo (KIM et al., 2013).

Assim, faz-se necessário o entendimento dos processos biológicos envolvidos na sinalização, captação e utilização de diferentes nutrientes. Nesse contexto, duas vias, descritas em *S. cerevisiae*, se destacam quanto à natureza do consumo preferencial e repressão por glicose: a via Snf3/Rgt2, que envolve a regulação da expressão de transportadores de glicose e, conseqüentemente, sua captação, e a via Snf1/Mig1, vinculada à utilização de fontes alternativas de carbono (STASYK; STASYK, 2019). Na presença de glicose, a primeira permite a expressão de genes que codificam transportadores de glicose; a segunda via reprime genes envolvidos com metabolismo de outras fontes de carbono, como a galactose (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014).

## **1.4. Via Snf3/Rgt2**

### ***1.4.1. Snf3p/Rgt2p***

A via Snf3/Rgt2 (figura 1) representa uma cascata sensorial para detecção de níveis extracelulares de glicose e regulação da expressão de transportadores de glicose, codificados pelos genes *HXT* (STASYK; STASYK, 2019b). Ambas as proteínas são parálogas e possuem alta similaridade de sequência com transportadores de glicose; no entanto, no decorrer da evolução, perderam a capacidade de transportar qualquer substrato, tornando-se sensores de

membrana especializados em detectar níveis de glicose extracelular (CONRAD et al., 2014; HORÁK, 2013; STASYK; STASYK, 2019). Snf3p detecta baixos níveis de glicose, e é necessária para expressão de genes HXT codificantes de transportadores de afinidade alta e moderada, como Hxt7; Rgt2p detecta altos níveis do açúcar no ambiente extracelular, sendo requerida para expressão de genes HXT codificantes de transportadores de baixa afinidade, como Hxt1p (HORÁK, 2013; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014; STASYK; STASYK, 2019).

#### **1.4.2. Rgt1p**

Rgt1p é uma proteína localizada no núcleo que possui um domínio de ligação ao DNA do tipo “dedo de zinco” em sua porção N-terminal, ligando-se às sequência-consenso 5'-CGGANNA-3' presente em promotores da maioria dos genes *HXT* (HORÁK, 2013). Funciona principalmente como repressor de genes *HXT* na ausência de glicose, e o faz recrutando o complexo repressor geral Ssn6p-Tup1p e os fatores de transcrição responsivo à glicose Mth1p e Std1p (KIM et al., 2013). Na presença de glicose, é hiperfosforilada pela subunidade  $\alpha$  da proteína cinase A (PKA), dissociando-se do DNA (KIM et al., 2013; STASYK; STASYK, 2019).

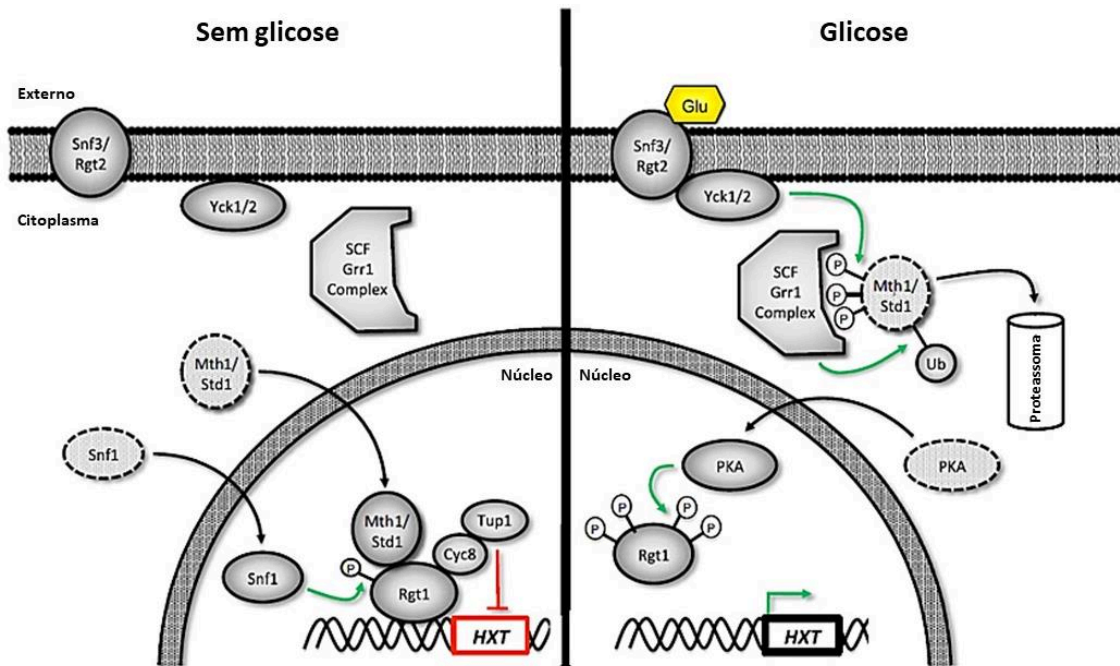
#### **1.4.3. Mth1p e Std1p**

Mth1p e Std1p são proteínas parálogas residentes no núcleo na ausência de glicose, interagindo com Rgt1p e mascarando os sítios de hiperfosforilação (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014) Mth1p estabiliza a ligação de Rgt1p com o complexo repressor Ssn6p-Tup1p; uma vez que Mth1p é degradada, a ligação Ssn6p-Tup1p-Rgt1p é prontamente desfeita (ROY et al., 2013). Std1p parece não regular a atividade de ligação ao DNA de Rgt1p (SABINA; JOHNSTON, 2009).

#### **1.4.4. Mecanismo de sinalização**

A presença de glicose extracelular causa mudança conformacional nos receptores, convertendo-os da forma inativa para a ativa. O sinal é transmitido de Snf3p/Rgt2p para caseína-cinases do tipo I associadas à membrana, Yck1p e Yck2p (CONRAD et al., 2014; HORÁK, 2013; KIM et al., 2013; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014; STASYK; STASYK, 2019) Embora acredite-se que essas proteínas ajam *downstream* ao sinal gerado pelos receptores de glicose, em um trabalho realizado por Snowdon e Johnston (2016) foi constatado que, em mutantes *RGT2SNF3*, a superexpressão de *YCK2* não induz a expressão de *HXT1* nem restaura a degradação de Mth1p, sugerindo que Ycks podem funcionar *upstream* aos sensores

de glicose. Além disso, a sinalização em um mutante *YCK* pode ser reprimida pela superexpressão do sensor Rgt2p (STASYK; STASYK, 2019). Mth1p e Std1p são recrutadas à membrana plasmática pelos sensores de glicose, fosforiladas pelas caseína-cinases Yck1/2p e posteriormente ubiquitinadas pelo complexo SCF<sup>Grr1</sup>, seguindo para degradação pelo proteossoma 26S (HORÁK, 2013). O processo geral está ilustrado na figura 1.



**Figura 1.** Via Snf3/Rgt2. A glicose extracelular é detectada pelos sensores de membrana Snf3p/Rgt2p (à direita), que ativam as caseína-cinases Yck1/2p, levando à fosforilação dos fatores de transcrição Mth1p/Std1p. A fosforilação é reconhecida pelo complexo ubiquitina ligase SCF<sup>Grr1</sup>, e tais proteínas são marcadas para degradação. Na ausência de glicose (à esquerda), Mth1p/Std1p não são degradadas, permanecendo no núcleo e ligando-se à Rgt1p, participando assim do complexo de repressão dos genes *HXT*. Com os sítios de hiperfosforilação por PKA mascarados por Mth1p/Std1p, Rgt1p é monofosforilada por Snf1p, o que permite a sua ligação ao DNA. A seta verde indica ativação, a caixa e linha vermelhas indica inibição e as setas pretas indicam eventos de realocação. Adaptado de Rødkær e Færgeman, 2014.

No entanto, há controvérsias sobre o local de degradação de Mth1p. Em um estudo realizado por Pasula et al. (2010), foram encontradas evidências de que a degradação de Mth1p ocorreria no núcleo e não exigiria interação direta dos sensores com Yck1/2p.

A dissociação de Mth1p e Std1p expõe os sítios de fosforilação, alvos da proteína-cinase A dependente de AMP (PKA); a hiperfosforilação leva à dissociação de Rgt1p dos promotores dos genes *HXT*, permitindo sua expressão (KIM et al., 2013; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014).

Na ausência de glicose, Rgt1p é fosforilada por uma cinase ativada por AMP (AMPK) denominada Snf1p; tal fosforilação permite à ligação ao DNA, o que acarreta repressão de genes *HXT* (PALOMINO; HERRERO; MORENO, 2006). Mth1p e Std1p não são recrutadas à membrana plasmática e degradadas, permanecendo no núcleo e participando do complexo de

repressão aos genes (CONRAD et al., 2014). Como explicitado mais adiante, a AMPK Snf1p é um componente chave para a via Snf1/Mig1.

## **1.5. Via Snf1/Mig1**

### ***1.5.1. Snf1p***

Snf1p é uma proteína serina/treonina cinase heterotrimérica altamente conservada em todos os eucariotos, necessária para homeostase energética em mamíferos, plantas e fungos; faz parte da família das proteína-cinases AMPK, centrais na detecção e resposta a condições em que reservas energéticas são escassas, promovendo geração e preservação de energia (CONRAD et al., 2014; HORÁK, 2013). É composta por uma subunidade catalítica  $\alpha$  (Snf1p), uma subunidade  $\gamma$  (Snf4p) e subunidade regulatória  $\beta$  (Gal83p, Sip1p ou Sip2p), sendo essa última responsável pela localização subcelular na ausência de glicose - Sip1p é realocada à membrana vacuolar, Gal 83p é realocada ao núcleo e Sip2p permanece citoplasmática (COCCETTI; NICASTRO; TRIPODI, 2018). Além de estar envolvida na resposta conhecida como repressão por glicose, Snf1p está envolvida em processo como gliconeogênese, respiração, autofagia, ciclo do glioxalato, biogênese de peroxissomos, homeostase de acetil-CoA, acetilação de histonas, inibição de síntese de ácidos graxos e proteínas e na própria via Snf2/Rgt2 explicitada acima (CONRAD et al., 2014; HORÁK, 2013).

### ***1.5.2. Mig1p***

Mig1p é uma proteína de ligação ao DNA do tipo “dedo de zinco”, e é o principal componente envolvido na repressão de genes induzida por glicose, incluindo *GAL83*, *SUC2*, *MAL62*, *LAC4* e *LAC12* (ALIPOURFARD et al., 2019; NURCHOLIS et al., 2019). Na ausência de glicose, Mig1p é fosforilada em Ser311 por Snf1p, dissociando-se do DNA e sendo translocada para o citoplasma. Na presença de glicose, Mig1p é desfosforilada pela fosfatase Glc7-Reg1p e se localiza no núcleo, onde se liga aos promotores, recrutando o complexo de repressão Tup1p-Cyc8p (AHUATZI et al., 2004; PAPAMICHOS-CHRONAKIS; GLIGORIS; TZAMARIAS, 2004).

### ***1.5.3. Hexocinase 2***

Hexocinase 2 (Hxk2p) é uma proteína bifuncional, e localiza-se no núcleo e no citoplasma. No núcleo, na presença de glicose, age como um repressor transcricional de genes reprimidos por glicose em um complexo com Mig1p e outras proteínas (NURCHOLIS et al.,

2019). No citoplasma, faz parte da via glicolítica, catalisando a conversão ATP-dependente de hexoses para hexoses-6-fosfato (CHO et al., 2006). Na ausência de glicose, Hxk2p é fosforilada no resíduo serina 14 pela Snf1p, e posteriormente exportada do núcleo; quando os níveis de glicose aumentam, a proteína é desfosforilada pela fosfatase Glc7-Reg1p, retornando ao núcleo (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012).

#### **1.5.4. *Adr1***

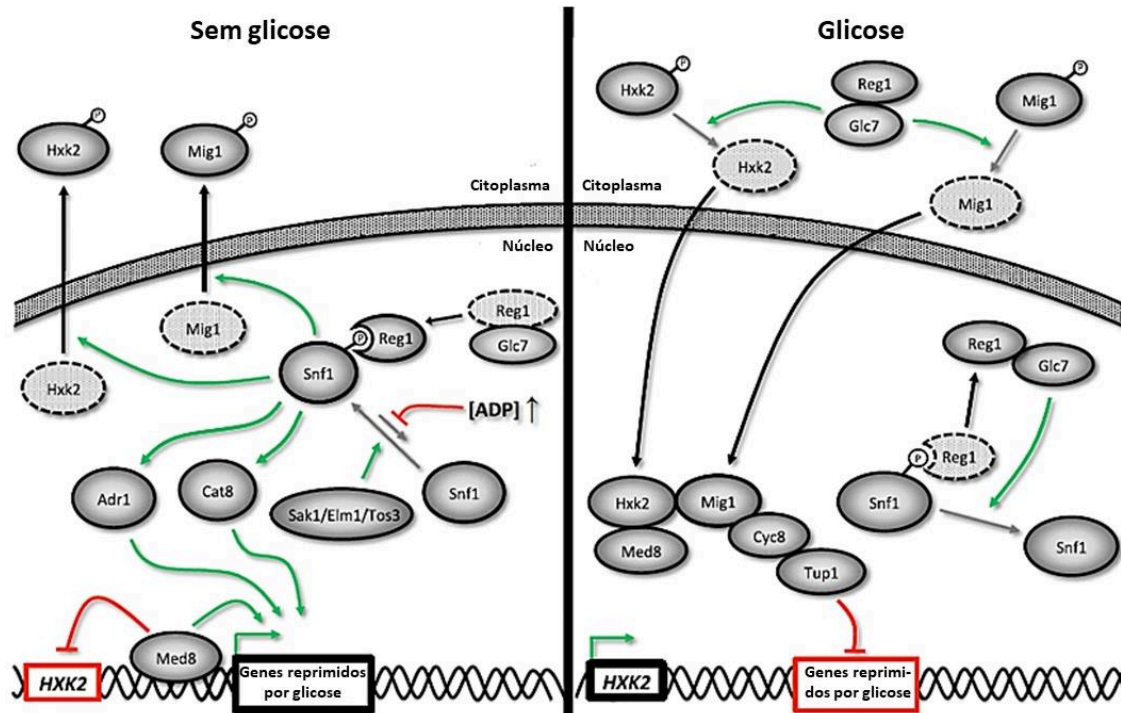
Em *Saccharomyces cerevisiae*, Adr1p é um ativador transcricional necessário para a expressão de genes envolvidos na conversão de substratos C<sub>2</sub> em acetil-CoA, como o *ADH2*, que codifica a enzima álcool desidrogenase (CHIANG et al., 1996; SCHÜLLER, 2003). Adr1p contém dois dedos de zinco adjacentes à região amino-terminal, ambas essenciais para a ligação ao DNA (CHENG et al., 1994).

#### **1.5.5. *Mecanismo de sinalização***

A via Snf1/Mig1, também conhecida como Mig1/Hxk2, é a principal via responsável pela resposta conhecida como *repressão por glicose*, na qual há inibição de genes relacionados tanto à utilização de fontes alternativas de carbono como gliconeogênese e atividade mitocondrial (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014; STASYK; STASYK, 2019).

Na presença de glicose, Mig1p encontra-se no núcleo, associada ao complexo de repressão Tup1p-Cyc8p e à Hxk2p, que mascara o sítio de fosforilação Ser311 de Mig1p, evitando sua exportação do núcleo (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014). Hxk2p, ainda, interage e regula negativamente o complexo mediador Med8p, uma subunidade da RNA polimerase II que possui efeito repressor no gene *HXK2* e ativador no gene *SUC2*, um dos genes reprimidos na presença de glicose (CHAVES et al., 1999; DE LA CERA et al., 2002). O processo geral está ilustrado na figura 2.

Na ausência de glicose, Snf1p é ativada pela fosforilação de Thr210 realizada por três cinases de função reduntante- Pak1p, Elm1p e Tos3p; acredita-se que o sinal esteja correlacionado com uma alta razão AMP/ATP (HONG et al., 2003; WILSON; HAWLEY; GRAHAME, 1996). Snf1p, então, fosforila Hxk2p em Ser14 e Mig1p em Ser311, causando a dissociação do complexo de repressão Tup1p-Cyc8p e exportação do núcleo de Hxk2p e Mig1p, consequentemente permitindo a expressão dos genes reprimidos (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; PAPAMICHOS-CHRONAKIS; GLIGORIS; TZAMARIAS, 2004; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014).



**Figura 2.** Via Snf1/Mig1. Na ausência de glicose (à esquerda), Snf1 é fosforilada em Thr210, subsequentemente fosforilando Hxk2 em Ser14 e Mig1 em Ser311, acarretando dissociação do complexo repressor Tup1-Cyc8. Hxk2 e Mig1 fosforiladas são exportadas do núcleo, e há a expressão dos genes anteriormente reprimidos. Na presença de glicose (à direita), Snf1, Hxk2 e Mig1 são desfosforiladas pela fosfatase Glc7-Reg1, e as duas últimas retornam ao núcleo, onde restituem sua atividade repressora. A seta verde indica ativação, a caixa e linha vermelhas indicam inibição, a seta cinza indica reação metabólica e as setas pretas indicam eventos de realocação. Adaptado de Rødkær e Færgeman, 2014.

Quando há aumento dos níveis de glicose, a fosfatase Glc7-Reg1p desfosforila Snf1p, Hxk2p e Mig1p, e as duas últimas retornam ao núcleo, onde restituem sua atividade repressora (AHUATZI et al., 2004; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014).

### 1.6. Interseção das vias Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig1

Para que as respostas às variações na concentração extracelular de glicose sejam eficientes e rápidas, as células de levedura integram e coordenam as vias de sinalização em uma rede regulatória complexa de mecanismos que opera aos níveis de expressão gênica e pós-traducional (HORÁK, 2013; STASYK; STASYK, 2019).

Em altas concentrações de glicose, os genes *MTH1* - codificante do repressor de genes *HXT* -, *SNF3* - codificante do sensor que induz a expressão de transportadores de alta afinidade -, *HXT2* e *HXT4* - codificantes de transportadores de hexoses - são reprimidos pelos fatores de transcrição Mig1p e Mig2p, um parálogo de Mig1p que não é regulado por Snf1p (KANIAK et

al., 2004; WESTHOLM et al., 2008). Mig2p é controlado transcricionalmente pela via Snf3/Rgt2, e é um repressor transcricional de Mig1p (KANIAK et al., 2004).

A presença de glicose estimula a degradação de Std1p, ao mesmo tempo que induz a expressão do gene *STD1*, de forma a permitir um rápido reestabelecimento da repressão quando a glicose estiver esgotada (KANIAK et al., 2004; KIM et al., 2013). Além disso, a atividade de Snf1p é aumentada por Std1p (KUCHIN et al., 2002).

Pode-se citar, ainda, que Glc7-Reg1p, a fosfatase que desfosforila Snf1p e, conseqüentemente, desativa a via Snf1/Mig1, é uma ativadora *upstream* das caseína-cinases Yck1/2p, agindo indiretamente nos repressores Mth1p e Std1p (GADURA; ROBINSON; MICHELS, 2006).

Hxk2p é a isoenzima hexocinase mais ativa no citoplasma durante o crescimento da célula em glicose, ao mesmo tempo interagindo com componentes repressores de muitos genes no núcleo (BUSTI et al., 2010). Além disso, como já citado anteriormente, Hxk2p inibe Med8, uma subunidade da RNA polimerase II que reprime o gene *HXX2* e ativa o gene *SUC2*, um dos genes reprimidos na presença de glicose (CHAVES et al., 1999; DE LA CERA et al., 2002).

## 1.7. Aspectos da regulação gênica

A transcrição gênica é um dos muitos mecanismos essenciais que as células usam para regular as funções celulares e responder a mudanças ambientais para sustentar a vida (HEBDON et al., 2021). Os mecanismos de regulação da transcrição gênica envolvem, em seu cerne, fatores de transcrição e regiões regulatórias não codificantes, normalmente *upstream* ao códon de iniciação. Adr1p, Mig1p, Cyc8p, Tup1p, Hxk2p, Rgt1p e Mth1/Std1p são fatores de transcrição das vias supracitadas, sendo a ponte o sinal entre o ambiente extracelular e modulação da expressão (CHIANG et al., 1996; HORÁK, 2013; NURCHOLIS et al., 2019; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014)

Essas regiões regulatórias não codificantes possuem motivos de ligação para os fatores de transcrição, ou *cis*-elementos, e contribuem para a montagem dos complexos que governam a transcrição do gene (RAIJMAN; SHAMIR; TANAY, 2008; WITTKOPP; KALAY, 2012)

O fato de que diferenças nos padrões de expressão gênica podem explicar diferentes fenótipos e respostas celulares torna o estudo dos *cis*-elementos crucial para o entendimento da variabilidade dos seres vivos. E de fato, considera-se que mutações em *cis*-elementos – e não em sequências proteicas – são a causa mais importante de divergência fenotípica (WITTKOPP; KALAY, 2012).

## 1.8. Transporte e utilização de D-glicose e D-xilose

Diversos trabalhos sugerem que o metabolismo de xilose da levedura *S. passalidarum* seja regulado pela repressão por glicose (DU et al., 2019; HOU, 2012b; LONG et al., 2012). Recentemente, Ribeiro et al (2021) analisaram a co-fermentação de xilose e glicose e produção de etanol, bem como a expressão de quatro genes relacionados ao metabolismo de xilose - xilose redutase 1/2 (*XYL1.1*, *XYL1.2*), xilitol desidrogenase (*XYL2.1*) e xilulose cinase (*XKSI*) - em meios de cultura distintos. Adicionalmente, foi demonstrado o perfil de crescimento de *S. passalidarum* em meio contendo 2-deoxiglicose.

No ensaio de co-fermentação, observou-se que o consumo de xilose iniciou apenas quando houve o esgotamento de glicose no meio, cerca de 12h após o inóculo. Além disso, verificou-se que, no meio contendo ambos os açúcares, quando ainda há glicose no meio, três dos quatro genes analisados - *XYL1.1*, *XYL1.2* e *XKSI* - encontram-se *down* regulados em relação à análise realizada no meio contendo apenas xilose. Já quando a glicose se esgota e inicia-se o consumo de xilose, notou-se que três dos quatro genes - *XYL1.1*, *XYL1.2* e *XYL2.1* - têm níveis de expressão similares àqueles observados em meio contendo apenas xilose. Esses resultados mostram que a glicose de alguma maneira interfere na expressão de genes relacionados ao metabolismo de xilose, o que está em consonância com a repressão de genes relacionados à utilização de fontes alternativas de carbono quando há glicose disponível discutida anteriormente (RIBEIRO et al., 2021).

Além do fenômeno de regulação gênica apresentado acima, a manutenção dos níveis de xilose no meio de cultura contendo glicose e xilose pode ser explicada pela captação preferencial de glicose, o que pode ser ocasionado devido a maior afinidade dos transportadores de açúcares por hexoses. Um outro mecanismo que leva ao consumo preferencial de glicose é a competição desta e de xilose pelo mesmo transportador de açúcar (HORÁK, 2013). Esses últimos possuem maior afinidade por hexoses em relação a pentoses, o que implica em inibição competitiva (SUBTIL; BOLES, 2012). No entanto, na levedura *S. passalidarum* esse fenômeno precisa ser melhor investigado, uma vez que seu sistema de transporte de açúcares não é caracterizado.

Para maiores esclarecimentos, Ribeiro et al (2021) estudaram o efeito da adição de 2-deoxiglicose (2DG) no crescimento de *Spathaspora passalidarum*, com concentrações de 2DG variando de 0.01% a 0.5%. Para controle positivo, utilizou-se a levedura *Kluyveromyces marxianus*, para a qual a repressão por glicose no metabolismo de xilose já foi demonstrada (SUPRAYOGI et al., 2015).

A 2DG é um análogo sintético da glicose no qual o grupo -OH de C2 é substituído por um hidrogênio. A molécula é captada pela célula através dos transportadores de hexoses, fosforilada em C6 pela hexocinase formando 2-deoxi-D-glicose-6-fosfato mas, pela falta do grupamento hidroxila em C2, não sofre isomerização a frutose-6-fosfato, de forma que se acumula no citoplasma e a via glicolítica é impedida de prosseguir (PAJAK et al., 2020). Assim, leveduras que possuem repressão por glicose não são capazes de crescer em meio contendo 2DG e outra fonte de carbono, uma vez que a 2DG ativa a via de repressão por glicose, impedindo a utilização da última (SUPRAYOGI et al., 2015).

No trabalho de Suprayogi et al, verificou-se que a 2DG não foi letal para *S. passalidarum* e não inibiu seu crescimento em nenhuma concentração. Ao contrário, a levedura *K. marxianus*, em meio contendo glicose, tem seu crescimento inibido a partir de 0,05% de 2DG, e em meio contendo xilose, a partir da primeira adição de 2DG, 0,01%. Os resultados obtidos para *K. marxianus* seriam os esperados para uma levedura que apresentasse perfil de repressão clássica por glicose; os resultados observados para *S. passalidarum*, portanto, sugerem que essa levedura não possui um perfil clássico de repressão, apesar de possuir consumo preferencial de glicose e genes do metabolismo de xilose *down* regulados na presença de glicose, como demonstrado anteriormente.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar se a levedura *S. passalidarum* possui os componentes da sinalização molecular de glicose, a fim de caracterizá-lo nesta levedura.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Identificar e analisar vias de repressão por glicose e sua influência no gene da xilose redutase *XYL1.1* de *Spathaspora passalidarum*.

### **2.2. Objetivos específicos**

**2.2.1.** Reconstruir *in silico* as vias clássicas de repressão por glicose em *Spathaspora passalidarum*.

**2.2.2.** Identificar *cis*-elementos referentes aos fatores de transcrição das vias Snf3/Rgt2 e Mig1/Snf1 nos promotores de genes relacionados ao metabolismo de xilose.

**2.2.3.** Avaliar a regulação da transcrição do gene *XYL1.1* de *S. passalidarum* através da clonagem do seu promotor em vetor contendo o gene repórter que codifica a  $\beta$ -galactosidase e

transformação em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. da via clássica de repressão por glicose.

**2.2.4.** Avaliar a influência da 2-deoxiglicose na expressão do gene que codifica a enzima xilose redutase de *S. passalidarum* NRRLY 27907.

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Reconstrução das vias clássicas *in silico***

##### **3.1.1. Recuperação das sequências referências de *Saccharomyces cerevisiae***

As proteínas componentes das vias Snf1/Mig1 e Rgt2/Snf3 em *Saccharomyces cerevisiae*, descritas em Rødkær e Færgeman (2014), tiveram suas sequências proteicas recuperadas do *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/>). Estas foram utilizadas como referência para busca de homólogos em bancos de dados através da ferramenta tBlastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

##### **3.1.2. Busca por sequências homólogas**

Nesta etapa, a sequência proteica de *S. cerevisiae* recuperada na plataforma SGD foi utilizada como protótipo para a busca de sequências similares no genoma de *Spathaspora passalidarum* (taxid: 340170) utilizando-se a ferramenta tBlastn (parâmetros *default*). Essa etapa teve de ser realizada devido à falta de dados de transcritos e proteínas de *S. passalidarum*, de forma que a busca de uma correspondência direta entre proteínas acarretaria muitos erros. As sequências preditas encontradas no banco de dados que possuíam identidade acima de 30%, cobertura acima de 70% e E-value abaixo de  $10^{-5}$ , foram consideradas sequências homólogas putativas às sequências de referência de *S. cerevisiae*.

Para sequências cujos resultados foram mRNA parcial, a janela de busca foi expandida manualmente, na própria plataforma, em cerca de 1000 nucleotídeos à montante e à jusante. Já para sequências que não foram encontradas pela busca no tBlastn, foi realizada uma busca adicional através da ferramenta blastp. Nesse caso, utilizou-se a sequência proteica recuperada na plataforma SGD para realizar uma busca pelo arquivo de proteoma de *S. passalidarum* NRRLY 27907, disponibilizado na plataforma NCBI.

Posteriormente, realizou-se a tradução e comparação de parâmetros proteicos da(s) sequência(s) correspondente(s).

##### **3.1.3. Tradução da sequência e verificação de parâmetros**

A sequência de nucleotídeos de *S. passalidarum* obtida na etapa anterior foi traduzida em sua sequência de aminoácidos pela ferramenta *Translate* na plataforma ExPASy, parâmetros *default* (<https://www.expasy.org/>); selecionou-se a sequência que apresentou a maior ORF (*Open Reading Frame*).

Pressupõe-se que, em proteínas homólogas, características como tamanho, peso molecular e ponto isoelétrico sejam relativamente conservados. Para verificar isso, analisou-se a sequência traduzida na ferramenta *Protparam* (parâmetros *default*), na mesma plataforma, que fornece informações que podem ser comparadas às da proteína de referência de *S. cerevisiae*.

Uma vez estimados os parâmetros, a sequência seguiu para análise de domínios.

#### **3.1.4. Análises de domínios**

Realizou-se predição de domínios proteicos na plataforma Pfam (parâmetros *default*), para verificar se há conservação de função pela proteína de *S. passalidarum*.

#### **3.1.5. Avaliação da identidade global**

A identidade global entre a sequência de referência de *Saccharomyces cerevisiae* e a sequência obtida de *Spathaspora passalidarum* foi determinada utilizando-se a plataforma de alinhamento global ClustalW (parâmetros *default*).

#### **3.1.6. Reconstrução das vias**

A reconstrução das vias foi realizada adaptando-se as figuras de Rødkær e Færgeman (2014) das vias Snf1/Mig1 e Rgt2/Snf3 em *Saccharomyces cerevisiae*. Para proteínas muito similares em sequência, atribuiu-se a cor verde; para proteínas que possuíam domínios faltando ou baixa identidade, atribuiu-se a cor laranja; para proteínas sem similaridade encontrada, atribuiu-se a cor vermelha.

### **3.2. Busca por *cis*-elementos de fatores de transcrição das vias clássicas nos promotores dos genes do metabolismo de xilose**

Os motivos de ligação dos fatores de transcrição presentes das vias clássicas foram buscados nas sequências *upstream* dos genes relacionados ao metabolismo de xilose - xilose redutase 1/2 (*XYL1.1*, *XYL1.2*), xilitol desidrogenase (*XYL2.1*) e xilulose cinase (*XKS1*) - de *S. passalidarum*. Através das sequências gênicas depositadas no NCBI, recuperou-se a sequência

dos promotores selecionando 1000 nucleotídeos *upstream* ao códon de iniciação (ATG) de cada gene. Tais sequências seguiram para análise na plataforma Yeastract (<http://www.yeastract.com/>) pela ferramenta “Find TF Binding Sites) para predição dos *cis*-elementos correspondentes a esses três fatores de transcrição.

### 3.3. Ensaios de fermentação e co-fermentação de xilose, xilose e 2-deoxiglicose (2DG) e xilose e glicose

Para os ensaios de co-fermentação, células de *S. passalidarum* NRRLY 27907, provenientes de três colônias distintas, foram inoculadas *overnight* em três frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 mL de meio YPD (1% m/v de extrato de levedura, 2% m/v de peptona e 2% m/v de glicose), a 30°C sob agitação de 150 rpm. A partir do pré-inóculo, a D.O<sub>(600nm)</sub> foi ajustada (~1,0) em seis frascos Erlenmeyer de 25ml com 5 mL de meio de cultura – três contendo YP + xilose (2% m/v), três contendo YP + xilose (2% m/v) + 2DG (0,5% m/v) e três contendo YP + xilose (2% m/v) + glicose (0,5% m/v). Os frascos foram mantidos a 30°C sob agitação de 150 rpm por 8 horas, com alíquotas retiradas nos tempos 0 e 8 horas para a fermentação de xilose e a co-fermentação de xilose e 2DG e nos tempos de 0, 2 e 8 horas para a co-fermentação de xilose e glicose. Tais amostras foram destinadas à medição da D.O<sub>(600nm)</sub>, análise em HPLC e extração de RNA.

### 3.4. Análise da expressão gênica

A análise transcricional do gene *XYL1.1* foi realizada por RT-qPCR. As alíquotas retiradas nos ensaios de co-fermentação foram tratadas com enzima liticase de *Arthrobacter luteus* (Sigma) por 1h a 30°C a 60 rpm. Posteriormente, a extração de RNA total foi realizada com reagente Trizol seguindo as recomendações do fabricante e tratado com DNase 1 (Sigma). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se o Platus Transcriber RNase H- cDNA First Strand Kit (Sinapse Inc), com a seguinte programação: 42°C por 60 min e 70°C por 5 min. As reações de qPCR foram realizadas usando o StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante e sob as seguintes condições de amplificação: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min. A especificidade das amplificações foi analisada a partir da determinação da curva de dissociação (*melting*). Construiu-se uma curva padrão relacionando o Ct médio da duplicata técnica com o log<sub>10</sub> da concentração de diluições seriadas do cDNA da amostra controle. As concentrações utilizadas foram 50, 25, 12,5, 6,25,

3,12, 1,56 e 0,78 ng/ $\mu$ L. Utilizou-se o coeficiente angular da regressão linear obtida (slope) para calcular a eficiência de amplificação de cada gene de acordo com a seguinte equação:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ . Utilizou-se concentração final 1  $\mu$ M para os *primers*, e 20ng de cDNA para a montagem de todas as placas.

Empregou-se o método de quantificação absoluta por curva-padrão para analisar os níveis de expressão de mRNA. Inicialmente, fez-se a média dos valores de Ct das duplicatas técnicas; em seguida, substituiu-se tais valores nas respectivas equações de regressão linear obtidas para cada gene. A normalização das quantificações obtidas para cada gene deu-se pela divisão dessas pela quantificação do endógeno (*ACT1*) em cada réplica biológica. O resultado final das análises corresponde à média dos valores obtidos da divisão pelo endógeno. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5, utilizando teste T bicaudal não pareado para a comparação dos níveis de expressão do gene em meio contendo apenas xilose e em meio contendo xilose e 2-deoxiglicose.

### 3.5. Clonagem do promotor da xilose redutase (*XYL 1.1*) de *S. passalidarum* no sistema pLacZi

Através das sequências gênicas depositadas no NCBI, recuperou-se a sequência do promotor de *XYL 1.1* selecionando-se 1000 nucleotídeos *upstream* ao códon de iniciação (ATG) do gene, da posição -1 à -1000. A sequência obtida foi utilizada para desenho de primers, sendo a especificidade de alinhamento destes verificada na plataforma online Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As enzimas de restrição possíveis de serem utilizadas foram determinadas através da plataforma online NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), submetendo à seleção de “0 cutters”. Foram escolhidas as enzimas de restrição HindIII e XhoI. Posteriormente, adicionou-se os sítios de restrição das enzimas escolhidas com o auxílio da ferramenta Promega Restriction Enzyme Tool (<https://www.promega.com.br/resources/tools/retool/>).

As bases extras foram determinadas através da ferramenta Cleavage Close to the End of DNA Fragments (<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>).

**Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos para a região promotora do gene de *XYL 1.1* de *S. passalidarum***

<b>Primer forward 5'-3'</b>	<b>Primer reverse 5'-3'</b>
-----------------------------	-----------------------------

TTAA <b>AAGCTT</b> ATCGGAACGGCGAAATTGATAC	GAGAC <b>TCGAG</b> GAAAGAGAATTGAAAAAATTG
---	--

Os nucleotídeos em negrito indicam os sítios de restrição para as enzimas de restrição HindIII e XhoI, respectivamente.

A região promotora foi amplificada a partir do DNA de *S. passalidarum* com o seguinte ciclo de temperatura: 95°C por 45s, 52,5°C por 45s e 72°C por 2min. Posteriormente, utilizou-se o amplicon para clonagem no sistema pGEM®-T Easy Vector (Promega) segundo as recomendações do fabricante, que foi propagado em *E. coli* DH5α. Para confirmação da clonagem, realizou-se dupla digestão com as enzimas HindIII (Promega) e XhoI (Thermo Fisher) a 37°C por 1 hora, utilizando-se 1µg de vetor. Os resultados foram avaliados em gel de agarose 1% com 1kb ladder (Sinapse) como referência.

## 4. Resultados

### 4.3. *Spathaspora passalidarum* possui as vias clássicas de sinalização por glicose Snf3/Rgt2 e Mig1/Snf1

As vias clássicas de resposta à glicose Snf3/Rgt2 e Mig1/Snf1 foram reconstruídas *in silico* para *S. passalidarum* com base em sequências proteicas de *Saccharomyces cerevisiae* disponíveis no bando de dados SGD (<https://www.yeastgenome.org/>). A tabela 2 apresenta informações sobre as sequências de referência de *S. cerevisiae* e sobre os alvos encontrados em *S. passalidarum* – tamanho da proteína, domínios e identidade global.

A figura 3 mostra a reconstrução das vias em *S. passalidarum*, com a cor dos componentes representando o nível de similaridade em relação às sequências de referência de *S. cerevisiae*. Sequências que possuíam identidade acima de 30%, cobertura acima de 70% e e-value abaixo de  $10^{-5}$  foram consideradas homólogas, e tiveram a cor verde atribuída a elas; às sequências que não preencheram todos esses requisitos, mas que conservaram semelhanças, atribuiu-se a cor amarela. Sequências para as quais não foram encontradas similaridades encontram-se em vermelho.

A partir da tabela 1 e da figura 3 é possível perceber que ambas as vias mapeadas possuem componentes em *S. passalidarum*. As enzimas Hexocinase (Hxk2) – converte hexoses em hexoses-6-fosfato – Glc7 – fosfatase responsável por desfosforilar Mig1 – e Snf1 – proteína-quinase com múltiplas funções – tiveram as sequências mais conservadas em relação aos demais componentes de ambas as vias, e foram consideradas proteínas homólogas às de *S. cerevisiae*

(verde). Esse resultado era esperado, uma vez que tais enzimas desempenham papéis centrais em diversos outros processos fisiológicos.

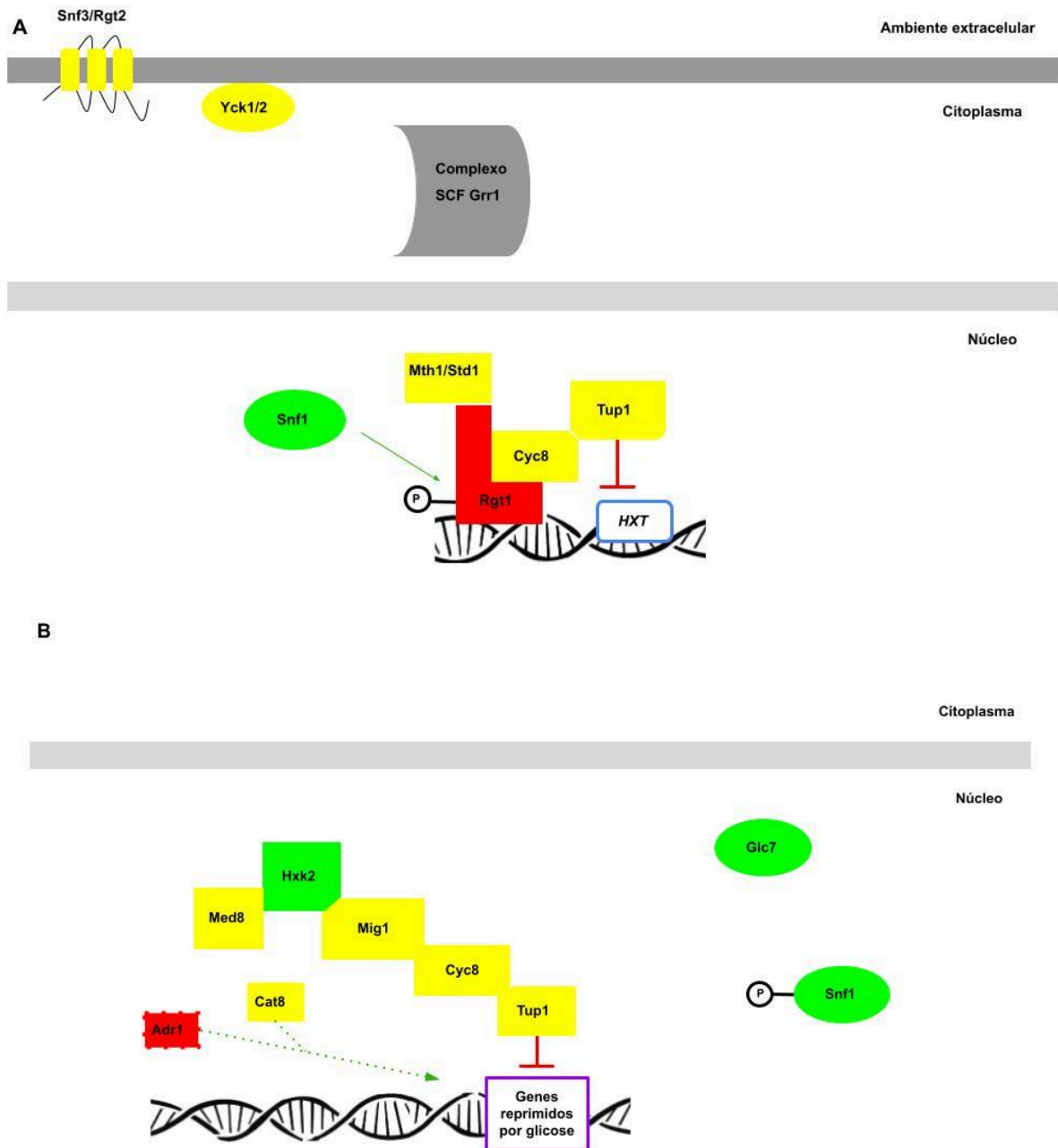
A maioria dos componentes apresentaram similaridades com as sequências de *S. cerevisiae* utilizadas como referência (amarelo). O asterisco em Mig1 na tabela 2 indica que a análise dessa proteína foi realizada em trabalho anterior por Castro, 2019. Apesar de não cumprirem todos os requisitos para serem consideradas proteínas homólogas (identidade acima de 30%, cobertura acima de 70% e e-value abaixo de  $10^{-5}$ ), todas possuíam os mesmos domínios funcionais, segundo análises no Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). A preservação de domínios pode indicar preservação de função, o que sugere que esses elementos estão presentes em *S. passalidarum* de maneira similar à *S. cerevisiae*.

No entanto, há duas exceções, marcadas de vermelho na tabela e na figura: os fatores de transcrição Rgt1p – integrante da via Snf3/Rgt2 – e Adr1p – integrante da via Mig1/Snf1. Para esses alvos, as análises das sequências de referência de *S. cerevisiae* na ferramenta online tBlastn não retornaram nenhuma sequência correspondente no genoma de *S. passalidarum*. Uma busca adicional foi realizada cruzando-se a sequência proteica de referência com o proteoma de *S. passalidarum* depositado no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta blastp. Não foram encontradas sequências proteicas correspondentes para Rgt1 e Adr1 no arquivo de proteínas de *S. passalidarum*.

**Tabela 2:** Lista de componentes das vias Snf3/Rgt2 e Mig1/Snf1 identificadas em *S. passalidarum*.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>Spathaspora passalidarum</i>			
Via	Nome	Tamanho (a.a)	Domínios	Identificador	Tamanho (a.a)	Domínios	Identidade global (%)
<b>Snf3/Rgt2</b>	Rgt2	763	Sugar (and other) transporter	XM_007376130.1	700	Sugar (and other) transporter	46.93
	Snf3	884	Sugar (and other) transporter				45.72
	Rgt1	1170	Zn clus	-	-	-	-
	Cyc8	966	Tetratricopeptide repeat (TPR1)	XM_007376526.1	837	TPR1, TPR17	48.54
	Tup1	713	TupN, WD40 G-beta repeat (3x)	XM_007371968.1	621	TupN, WD40 G-beta repeat (5x)	57,97
	Mth1	433	STD1	XM_007376593.1	347	STD1	30,41
	Std1	444	STD1				29,33
	Yck1	538	Pkinase	XM_007376408.1	514	Pkinase	63,01
	Yck2	546	Pkinase				64,44
<b>Mig1/Snf1</b>	Snf1	633	Pkinase, AdenylateSensor, UBA2	XM_007375245.1	601	Pkinase, AdenylateSensor, UBA2	67.23
	Hxk2	486	Hexokinase 1, Hexokinase 2	XM_007373744.1	483	Hexokinase 1, Hexokinase 2	68.26
	Glc7	312	Calci.-like phospho., STPPase N	XM_007373744.1	328	Calci.-like phospho., STPPase N	89.10

	Cat8	1433	Fungal trans, Zn cluster	XM_007376911.1	1006	Fungal trans, Zn cluster	25.38
	Mig1*	504	Zf C2H2	XM_007374141.1	543	Zf C2H2	26.63
				XM_007375475.1	457	Zf C2H2	30.75
	Adr1	1323	Zf C2H2	-	-	-	-
	Med8	223	Med8	XM_007374490.1	237	Med8	33.17



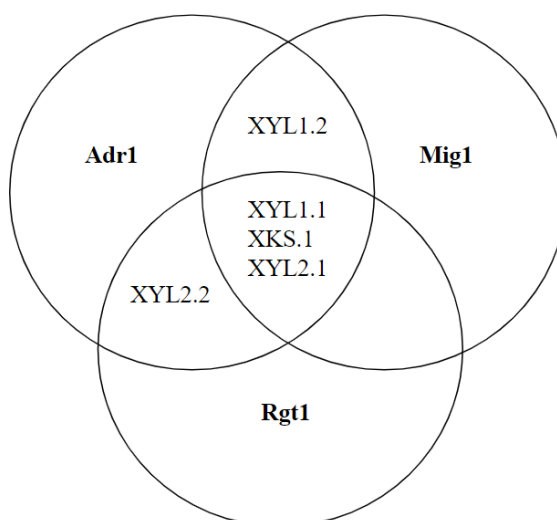
**Figura 3:** Reconstrução *in silico* das vias Snf3/Rgt2 (A) e Mig1/Snf1 (B). As cores refletem o nível de similaridade da sequência de *S. passalidarum* em relação à sequência de referência de *S. cerevisiae*. As sequências muito similares e cumpriram os requisitos explicitados no texto foram marcadas de verde; as que possuíam alguma similaridade foram marcadas de amarelo; as que não possuíam semelhanças foram marcadas de vermelho.

#### 4.4. *Cis*-elementos de fatores de transcrição das vias clássicas estão presentes nos promotores de genes envolvidos no metabolismo de xilose

Para analisar se os genes codificadores das enzimas envolvidas no metabolismo de xilose podem estar sob controle de fatores de transcrição das vias clássicas, realizou-se uma busca por *cis*-elementos nas sequências promotoras dos genes XYL1.1 e XYL1.2 (xilose redutase), XYL2.1 e XYL2.2 (xilitol desidrogenase) e XKS1 (xilulose cinase). A partir das sequências depositadas no banco de dados NCBI, recuperou-se 1000 nucleotídeos *upstream* ao códon de iniciação, e seguiu-se para análises na plataforma online Yeabstract.

Foram encontrados motivos de ligação para os fatores de transcrição Rgt1 – presente na via Snf3/Rgt2 – Adr1 e Mig1 – presentes na via Snf1/Mig1. A figura 4 apresenta, na forma de um diagrama de Venn, os resultados obtidos nas análises das regiões promotoras dos genes alvos. É possível perceber que, para as sequências de XYL1.1, XYL2.1 e XKS1, foram encontrados *cis*-elementos para os três fatores de transcrição; para XYL1.2, verificou-se motivos de ligação de Adr1 e Mig1; por último, para XYL2.2, foram encontrados *cis*-elementos para Adr1 e Rgt1.

A tabela 3 reúne os fatores de transcrição encontrados, suas sequências consenso, em quais regiões promotoras estão e o número de motivos de ligação presentes. Os promotores dos genes *SUC2* E *ADH2* de *S. cerevisiae* foram utilizados para mostrar que as sequências consenso são iguais para todos os fatores. Os *cis*-elementos de Mig1 são os mais abundantes, seguido por Adr1 e Rgt1. Os motivos de Mig1 encontram-se ausentes apenas na região de XYL2.2. As posições dos *cis*-elementos ao longo da sequência promotora estão ilustradas no Anexo 1.



**Figura 4.** Diagrama de Venn contendo os fatores de transcrição Adr1, Mig1 e Rgt1 e, nas interseções, os genes envolvidos no metabolismo de xilose que os contém.

**Tabela 3.** Lista dos fatores de transcrição, sequências consenso e número de motivos de ligação encontrados nos promotores dos genes relacionados ao metabolismo de xilose

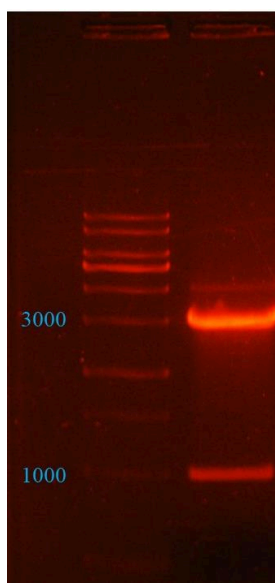
Fator de transcrição	Sequência consenso	Gene	Nº motivos de ligação
Adr1	TTGGRG	XYL1.1, XYL1.2, XYL2.1, XYL2.2, XKS.1, ADH2 (Sc)	1, 1, 2, 2, 3, 2
Mig1	SYGGRG	XYL1.1, XYL1.2, XYL2.1, XKS.1, SUC2 (Sc), ADH2 (Sc)	8, 5, 6, 5, 4, 2
Rgt1	CGGANNA	XYL1.1, XYL2.1, XYL2.2, XKS.1, SUC2 (Sc), ADH2 (Sc)	2, 1, 1, 1, 1, 6

Nas

sequências consenso, “R” significa purina; “S”, guanina/citosina; Y, pirimidina; N, adenina, guanina, citosina ou timina.

#### 4.5. Clonagem da região promotora do gene de *XYL1.1* de *S. passalidarum* em sistema pGEM®-T Easy Vector

A partir da figura 5, é possível observar que a região promotora do gene da xilose redutase (*XYL1.1*) foi clonado com sucesso no sistema pGEM®-T Easy Vector. As bandas inferiores em 1000pb representam a região promotora, recuperada do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a partir de 1000 nucleotídeos *upstream* ao códon de iniciação (ATG) do gene. As bandas superiores representam o vetor clivado pGEM®-T Easy (Promega), que possui 3000pb.



**Figura 5.** Eletroforese da digestão da construção pGEM®-T Easy e região promotora de *XYL1.1*. Esta última é representada pela banda em 1000pb, ao passo que o vetor clivado é representado pela banda em 3000pb.

Em trabalhos futuros, as bandas referentes à região promotora de *XYL1.1* serão recuperadas e purificadas, com o objetivo de avaliar se esse promotor está sujeito ao controle das vias clássicas. Será utilizado uma construção com o vetor pLacZi (mapa no Anexo 2), com o gene repórter LacZ sob o controle do promotor de *XYL1.1*. Esse vetor será utilizado para transformar células selvagens e mutantes de *S. cerevisiae*.

#### **4.6. 2-deoxiglicose impede a captação de xilose em *S. passalidarum* e não influencia no perfil de expressão de XYL1.1**

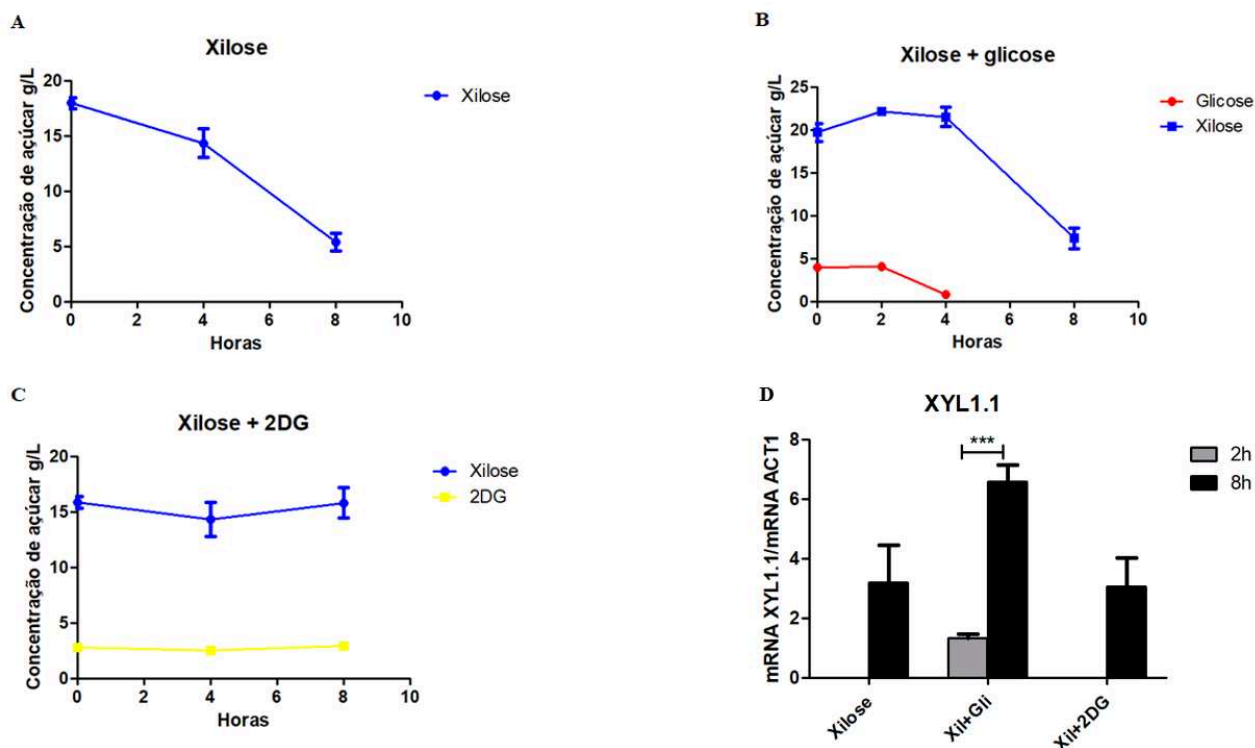
A fim de investigar os mecanismos pelos quais a glicose interfere no metabolismo de xilose em *Spathaspora passalidarum*, foram realizados experimentos de fermentação aeróbica com culturas contendo apenas xilose, xilose e glicose e xilose e 2-deoxiglicose (2DG). A 2DG é um análogo não metabolizável da glicose, no qual o grupo hidroxila de C2 é substituído por um hidrogênio. Na co-fermentação de xilose e glicose, foram retiradas alíquotas nos tempos de 2 e 8 horas; nas demais fermentações, retirou-se alíquotas apenas no tempo de 8 horas.

As figuras 6 a, b e c representam as cinéticas de fermentação de culturas apenas com xilose, com xilose e glicose e xilose e 2DG, respectivamente. A partir dos gráficos, é possível notar que, na co-fermentação de xilose e glicose (fig. 6b), a internalização e o consumo de xilose só se iniciam após o esgotamento de glicose no meio, após o tempo de 4 horas. De modo contrário, quando o cultivo é feito com apenas xilose como fonte de carbono, a taxa de consumo desta é mais alta. Esses dados mostram que há consumo preferencial de glicose em relação à xilose.

Já na co-fermentação de xilose e 2DG, representada na figura 9c, observa-se que não há variação da concentração de nenhum dos açúcares com o passar do tempo; ou seja, nem xilose e nem 2DG são internalizadas até as 8 horas de cultivo.

A expressão do gene *XYLL1.1*, que codifica a enzima xilose redutase, foi avaliada em 2 e 8 horas de cultivo para a co-fermentação de xilose e glicose e em 8 horas para as culturas contendo apenas xilose e xilose e 2DG. A xilose redutase catalisa a conversão de xilose a xilitol, a primeira etapa da via do catabolismo de xilose.

A partir da figura 6 d, é possível notar que, no tempo de 2 horas (cinza) na co-fermentação de xilose e glicose, quando ainda havia glicose no meio (fig. 6b), o gene foi menos expresso quando comparado ao nível de expressão de 8 horas de cultivo (preto), quando a glicose já havia se esgotado e só havia xilose no meio.



**Figura 6.** **A.** Cinética de consumo de xilose sob condições aeróbicas em meio contendo xilose (azul) 20g.L<sup>-1</sup>. **B.** Cinética de fermentação sob condições aeróbicas em meio contendo xilose (azul) 20g.L<sup>-1</sup> e glicose (vermelho) 5g.L<sup>-1</sup>. **C.** Cinética de fermentação sob condições aeróbicas em meio contendo xilose (azul) 20g.L<sup>-1</sup> e 2-deoxiglicose (amarelo) 5g.L<sup>-1</sup>. **D.** Análise de expressão do gene XYL1.1 em meios contendo 20g.L<sup>-1</sup> de xilose, 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 5 g.L<sup>-1</sup> de 2-deoxiglicose nos tempos de 2 horas (cinza) e 8 horas (preto). Os asteriscos indicam os valores das médias que são estatisticamente diferentes de acordo com teste t de Student (\*\*\*p<0.001).

O nível de expressão de XYL1.1 também foi menor na presença de glicose quando comparado às culturas de apenas xilose (fig. 6a) e xilose e 2DG (fig 6c) no tempo de 8 horas. Não houve diferença estatística entre os níveis de expressão gênica nos cultivos de xilose e xilose e 2DG.

## 5. Discussão

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica possui diversas vantagens econômicas, ambientais e sociais; contudo, para que o processo se torne viável, é preciso maximizar o rendimento de etanol por unidade de biomassa (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; HIMMEL et al., 1997; ROBAK; BALCEREK, 2018). Nesse contexto, destaca-se a importância do consumo de D-xilose como matéria prima para o processo de fermentação, visto que representa de 25% a um terço da composição da lignocelulose, sendo o segundo açúcar mais importante presente na natureza. (LIMAYEM; RICKE, 2012; MARIANO et al., 2013). Para que o potencial desse conteúdo de carbono seja aproveitado ao máximo, faz-se necessário o uso

de microrganismos que possam consumir, simultaneamente, hexoses e pentoses (OSIRO et al., 2018).

Atualmente, a espécie de levedura *Spathaspora passalidarum* é o microrganismo que possui os melhores rendimentos em produção de etanol e consumo de xilose (CADETE; ROSA, 2018). Entretanto, assim como para outras leveduras, a presença de glicose no meio impede o transporte e utilização de outras fontes de carbono, como a xilose, até que a glicose se esgote (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014). Esse fenômeno é conhecido como *repressão por glicose*, e é o resultado da ação de duas vias clássicas, descritas em *S. cerevisiae*: Snf3/Rgt2, que controla e expressão gênica de transportadores de hexoses, e Snf1/Mig1, que controla a expressão gênica de genes relacionados à utilização de outras fontes de carbono (RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014). Um dos objetivos do presente trabalho foi estudar tais vias em *S. passalidarum*, bem como a influência destas em genes relacionados ao metabolismo de xilose.

Os resultados das análises *in silico* das vias clássicas Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig1 em *Spathaspora passalidarum* mostraram que a maioria dos genes codificantes das proteínas de ambas as vias existem nessa levedura. Rgt2/Snf3, Yck1/2, Mth1/Std1, Cyc8 e Tup1 foram destacados em amarelo, indicando que, apesar de as sequências encontradas não cumprirem todos os pré-requisitos para serem consideradas proteínas homólogas, ainda mantinham os mesmos domínios funcionais. Para várias das sequências encontradas, é possível notar que duas sequências distintas em *S. cerevisiae* correspondem a apenas uma sequência em *S. passalidarum*. Isso se deve ao fato de a linhagem de *S. cerevisiae* ter sofrido no passado um evento de duplicação global do genoma (whole genome duplication – WGD), o que permitiu a aquisição de um metabolismo predominantemente fermentativo (ESCALERA-FANJUL et al., 2019). De maneira geral, os tamanhos das proteínas de *S. passalidarum* se mostraram menores do que as proteínas de *S. cerevisiae*, sendo mais discrepante entre os componentes da via Snf3/Rgt2. Uma vez que todos os elementos presentes apresentaram conservação em seus domínios, é provável que a perda de aminoácidos tenha ocorrido em outras partes da proteína.

Não foi encontrado nenhum alvo em *S. passalidarum* que fosse ortólogo similar a Rgt1p; por esse motivo, a marcação foi feita na cor vermelha. Rgt1p é a proteína responsável por recrutar o complexo repressor geral Ssn6p-Tup1p e os fatores de transcrição Mth1p/Std1p aos promotores dos genes *HXT*, acarretando sua repressão (KIM et al., 2013). Dessa forma, Rgt1 é um componente chave para que haja a repressão de genes codificadores de transportadores de glicose na ausência desse açúcar. Além disso, em altas concentrações de glicose, Rgt1 tem função adicional de ativador de *HXT1*, uma vez que a expressão de *HXT1* em

altos níveis de glicose é reduzida em um mutante  $\Delta rgt1$  (SABIRE; LEONG; JOHNSTON, 1996).

Rgt1 possui função neutra em baixos níveis de glicose, não agindo como repressor ou ativador; dessa forma, tendo evoluído no intestino de um besouro, um ambiente com baixas concentrações relativas de açúcar, sugere-se que, em *S. passalidarum*, a pressão seletiva para manter a função de repressor e ativador tenha sido pequena (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009; SABIRE; LEONG; JOHNSTON, 1996). A ausência de Rgt1 também foi observada na levedura não convencional *Scheffersomyces stipitis*, também encontrada associada ao intestino de besouros habitantes de madeira (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009).

Em seu trabalho, Osiro et al mostrou que as vias Snf1/Mig1 e Snf3/Rgt2 em cepas de *S. cerevisiae* engenheiradas para a utilização de xilose respondem à presença de xilose. A resposta de Snf3/Rgt2 acontece através dos transportadores HXT2/4p, normalmente ativados em baixas concentrações de glicose. Adicionalmente, Wu et al demonstrou que, em uma cepa de *S. cerevisiae* contendo genes do metabolismo de xilose e de parte da via das pentoses-fosfato, o mutante  $\Delta rgt1$  de *S. cerevisiae* teve o consumo específico de xilose aumentado em 24% em meio contendo apenas xilose, e 23% em co-fermentação de xilose e glicose. Esses resultados podem oferecer possíveis explicações sobre a maior eficiência de consumo de xilose por leveduras não convencionais como *S. passalidarum* e *S. stipitis*.

Para a via Snf1/Mig1, foram destacadas em verde as proteínas Snf1, Hxk2 e Glc7, indicando que as sequências encontradas em *S. passalidarum* são muito conservadas em relação às sequências de referência de *S. cerevisiae* - identidade acima de 30%, cobertura acima de 70% e e-value abaixo de  $10^{-5}$ . O alto nível de conservação era esperado, uma vez que as três proteínas exercem diferentes funções na célula. Snf1 participa do controle de diversas vias em todos os eucariotos. Em leveduras, essa proteína faz parte da sinalização de processos como meiose, formação de esporos, envelhecimento, autofagia, crescimento filamentosos, estresse oxidativo, pH alcalino, entre outros (SHASHKOVA; WELKENHUYSEN; HOHMANN, 2015). É importante ressaltar que, apesar de a proteína Snf1 ter sido enquadrada como integrante da via Snf1/Mig, ela também faz parte da via Snf3/Rgt2, e é responsável por integrar as respostas fisiológicas na presença e ausência de glicose. Hxk2 faz parte tanto da via glicolítica, catalisando a conversão de hexoses a hexoses-6-fosfato, quanto age como repressor transcricional de genes relacionados ao metabolismo de fontes alternativas de carbono (CHO et al., 2006; NURCHOLIS et al., 2019). Por fim, Glc7 é uma fosfatase que, além de restaurar as formas repressoras de Snf1p, Hxk2p e Mig1p, tem papel central no metabolismo de

glicogênio, iniciação da tradução, transcrição, mitose e esporulação (AHUATZI et al., 2004; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; LIN et al., 2015; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014).

As proteínas Mig1, Cyc8, Tup1, Med8 e Cat8 foram destacadas em amarelo, indicando que, apesar da baixa similaridade com sequências de *S. cerevisiae*, os domínios funcionais foram conservados. Divergências maiores em fatores de transcrição são esperadas, uma vez que se considera que a diversidade fenotípica e especiação ocorre primariamente pela alteração da regulação gênica do que alteração na função de proteínas individuais (HAHN; YOUNG, 2011).

Não foi encontrado nenhum alvo em *S. passalidarum* que fosse ortólogo similar a Adr1; portanto, a marcação foi feita na cor vermelha. Adr1 é um fator de transcrição que atua na ativação da expressão de genes reprimidos por glicose, como genes envolvidos na gliconeogênese e conversão de substratos C<sub>2</sub> em acetil-CoA (CHIANG et al., 1996; RØDKÆR; FÆRGEMAN, 2014; SCHÜLLER, 2003). Adr1 é necessário, por exemplo, para a expressão de *ADH2*, gene que codifica um tipo de álcool desidrogenase, responsável por catalisar a primeira etapa de oxidação do etanol. Outros genes importantes para a utilização de etanol e glicerol e codificadores de componentes da via de oxidação de ácidos graxos também têm sua expressão ativada por Adr1, como a glicerol-cinase (*GLUT1*) e a catalase A (TAYLOR et al., 1995; YOUNG et al., 2003). Em um trabalho realizado por Dzanaeva et al, mutantes  $\Delta$ *adr1* em cepas de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose apresentaram leve redução no acúmulo de biomassa em culturas com xilose, maior produção de acetato, menor crescimento em glicerol, além de não apresentar alterações no metabolismo de glicose ou na produção de etanol a partir desta. Por outro lado, a superexpressão de *ADR1* acarretou maior produção de xilitol, menor produção de etanol a partir de glicose e não afetou o crescimento em meios contendo xilose ou glicerol. Ambos os mutantes *ADR1* e  $\Delta$ *adr1* apresentaram queda na produção de etanol a partir de xilose. Esses resultados evidenciam o amplo espectro de ação desse fator de transcrição, tornando difícil a formulação de hipóteses sobre as consequências de sua possível ausência.

Fatores de transcrição se ligam em regiões promotoras ou regulatórias – *cis*-elementos - dos genes alvos, modulando a expressão destes – ativando ou reprimindo – através do recrutamento de maquinarias de transcrição ou repressão (HAHN; YOUNG, 2011). Assim, mutações que afetam a atividade de sequências *cis*-regulatórias – substituições, inserções ou deleções – alteram os sítios de ligação de fatores de transcrição através da perda/ganho de sequências ou mudanças de afinidade do sítio. Tais mutações são consideradas a causa mais importante de divergência fenotípica (WITTKOPP; KALAY, 2012). A análise das regiões

promotoras dos genes das enzimas envolvidas no metabolismo de xilose de *S. passalidarum* mostrou que *XYL1.1/2*, *XYL2.1/2* e *XKS* possuem motivos de ligação para três fatores de transcrição integrantes das vias clássicas: Rgt1, Adr1 e Mig1. Esse resultado levanta a hipótese de que esses genes podem estar sob regulação dessas vias, uma vez que seus promotores possuem *cis*-elementos para tais fatores de transcrição. No entanto, as análises *in silico* realizadas não encontraram as sequências proteicas de Rgt1 e Adr1 em *S. passalidarum*, o que, em teoria, deixaria *XYL1.1/2*, *XYL2.1/2* e *XKS* sob regulação apenas de Mig1. Há uma escassez, porém, de trabalhos que abordem estudos sobre os promotores dos genes de enzimas envolvidas no metabolismo de xilose; dessa forma, são necessários mais experimentos para elucidar tal regulação. Uma forma de investigar se esses genes estão sob a regulação dos fatores de transcrição pertencentes às vias clássicas é fazer uma construção de seus promotores e um plasmídeo que contenha um gene repórter. Assim, será possível concluir se os promotores de *XYL1.1/2*, *XYL2.1/2* e *XKS* estão sob o controle das vias Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig1.

Os resultados obtidos a partir das fermentações e da análise de expressão gênica da xilose redutase – XYL1.1 – sugerem que há repressão pela via clássica e controle de inibição do transporte de xilose por glicose. Na figura 6b, é possível notar que só há consumo de xilose quando a glicose se esgota no meio, após 4 horas de cultivo. Adicionalmente, na figura 6d, observa-se que, na análise de expressão de XYL1.1 em co-fermentação com xilose e glicose, os níveis de expressão gênica em 2 horas, quando ainda há glicose no meio, são muito mais baixos do que os níveis de expressão em 8 horas, quando toda a glicose já foi consumida. Esses dados condizem com o perfil de repressão clássica por glicose; além disso, as análises *in silico* mostram que os componentes das vias de repressão são conservados em *S. passalidarum*, o que sustenta essa hipótese. No entanto, em seu trabalho, Ribeiro et al observou que *S. passalidarum* é capaz de crescer na presença de 2DG, ao passo que outras leveduras, como *Kluyveromyces marxianus*, têm seu crescimento inibido mesmo em baixas concentrações de 2DG. Esse resultado sugere que as vias clássicas de repressão por glicose podem ter mecanismos distintos em *S. passalidarum*, o que poderia ser explicado pelas divergências encontradas entre os fatores de transcrição estudados *in silico*.

A partir da figura 6c, é possível notar que, na co-fermentação com xilose e 2DG, a xilose não entra na célula – e tampouco a 2DG. Esses resultados são condizentes com os observados por Ribeiro et al e Hou et al, e indicam que 2DG age a nível de transporte, impedindo que xilose entre na célula (HOU, 2012; RIBEIRO et al., 2021). A figura 6d mostra que os níveis de

expressão de XYL1.1 em culturas contendo apenas xilose e xilose e 2DG após 8 horas de cultivo foram estatisticamente iguais; isso sugere que não há indução de XYL1.1 na presença de xilose.

A 2DG, quando é transportada para dentro da célula, é convertida em 2DG-6-fosfato (2DG-6P) pela hexocinase; essa molécula, contudo, não serve de substrato para a próxima enzima da via glicolítica. Dessa forma, 2DG-6P acumula na célula, o que leva à inibição da hexocinase e diminuição da produção de ATP (SCHMIDT; O'DONNELL, 2021). O crescimento incomum de *S. passalidarum* na presença de 2DG pode estar relacionado ao fato de esta molécula não entrar na célula. Entretanto, Ribeiro et al observou que, após 12 horas de cultivo em meio contendo xilose e 2DG, os níveis dessa última decaem, por internalização ou por degradação da 2DG por algum mecanismo extracelular. No caso de a 2DG ser internalizada, é possível que *S. passalidarum* tenha mecanismos de resistência à sua presença na célula, como ativação mais prolongada de Snf1, mutações deletérias no gene de Glc7 (que desfosforila Snf1) ou maior expressão das fosfatases DOG1/2 (SCHMIDT; O'DONNELL, 2021).

## 6. Conclusão

O presente trabalho se propôs a analisar as vias clássicas de repressão por glicose em *Spathasora passalidarum* NRRLY 27907, bem como sua influência na captação de metabolismo de xilose. As análises *in silico* das vias Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig1 revelaram que, apesar de a maioria dos componentes das vias estarem presentes em *S. passalidarum*, muitos possuem baixa similaridade em relação às sequências de referência de *S. cerevisiae*. Além disso, o alvo final da via Snf3/Rgt2, a proteína repressora Rgt1, e um componente da via Snf1/Mig1, Adr1, não foram encontrados em *S. passalidarum*. Juntos, esses resultados indicam que podem existir mecanismos de controle distintos dessas vias em comparação com *S. cerevisiae*.

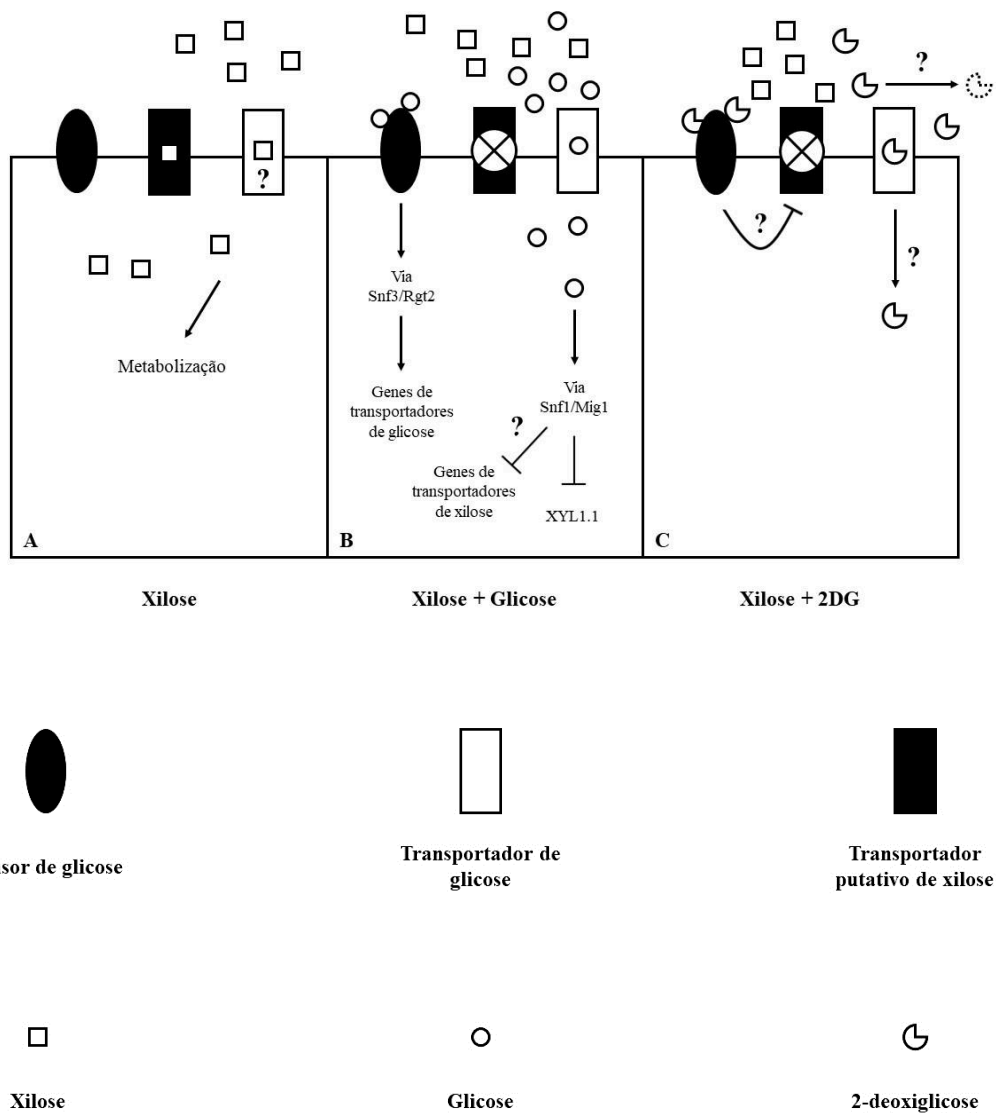
Análises *in silico* dos promotores dos genes de enzimas envolvidas no metabolismo de xilose indicaram a presença de *cis*-elementos para os fatores de transcrição Adr1, Mig1 e Rgt1, que compõem as vias clássicas de repressão por glicose. Isso sugere que esses genes podem estar sob regulação dessas vias; no entanto, são necessárias análises experimentais para validação desses resultados.

Observou-se um perfil de repressão clássica em XYL1.1 em meio contendo xilose e glicose. A análise conjunta do gráfico de co-fermentação e de expressão gênica revelam que, quando há glicose no meio, os níveis de expressão de XYL1.1 são cerca de seis vezes menores em relação aos níveis de expressão de quando a glicose já se esgotou. Adicionalmente, observou-se que os níveis de expressão desse gene em meio contendo apenas xilose e xilose e 2DG são estatisticamente iguais. Considerando que, no intervalo de tempo analisado, a 2DG

não é internalizada pela célula, isso sugere que a influência desse análogo no metabolismo de xilose ocorre a nível de transporte, e não de alteração da expressão gênica. Esse resultado indica, ainda, que não há indução de XYL1.1 pela presença de xilose.

Estudos anteriores mostraram que, após 12h de co-fermentação em meio contendo xilose e 2DG, os níveis de 2DG começam a cair. Duas hipóteses podem explicar esse fenômeno: ou a 2DG é internalizada pela célula ou há algum mecanismo extracelular que leva à sua degradação. Caso a 2DG seja internalizada, pode haver algum mecanismo de resistência que faz com que *S. passalidarum* consiga crescer em meio contendo 2DG, uma característica não observada em outras leveduras.

Considerando todos os resultados, foi proposto um modelo putativo de vias de detecção de glicose e captação e metabolismo de xilose em *S. passalidarum*, representado na figura 7.



**Figura 7.** Modelo putativo de vias de detecção de glicose e metabolismo de xilose em *Spathaspora passalidarum*. Xilose extracelular é internalizada pela célula, não se sabe ao certo se através de transportadores putativos de xilose

ou através de transportadores de hexoses, e é metabolizada (a). A glicose extracelular é, provavelmente, detectada por sensores intermembrana, que ativam a via Snf3/Rgt2, que por sua vez inibe a captação de xilose através da repressão de genes de transportadores de xilose. Assim, a glicose é internalizada primeiro e ativa a via Snf1/Mig1, que por sua vez reprime XYL1.1 (b). Na presença de 2DG, a inibição da captação de xilose pode estar ocorrendo por um mecanismo semelhante ao que acontece com glicose. Os sensores de glicose detectam a 2DG extracelular e ativam a via Snf3/Rgt2, impedindo a entrada de xilose na célula. A 2DG, posteriormente, pode estar sendo degradada no meio extracelular, o que permitiria, mais tardiamente, que a xilose fosse internalizada pela célula (c).

## 7. Referências

AHUATZI, D. et al. The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 14440–14446, 2 abr. 2004a.

ALIPOURFARD, I. et al. **MIG1 Glucose Repression in Metabolic Processes of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetics to Metabolic Engineering**. [s.l: s.n.].

ARORA, N. K.; MISHRA, I. COP26: more challenges than achievements. **Environmental Sustainability**, v. 4, p. 585–588, 2021.

BUSTI, S. et al. **Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces Cerevisiae***Sensors, jun. 2010.

CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, v. 35, n. 2, p. 191–199, 1 fev. 2018.

CASTRO, Alex Gazolla de. **Resposta ao estresse por etanol em *Saccharomyces cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum***. 2019. 175 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

CHAVES, R. S. et al. **Med8, a Subunit of the Mediator CTD Complex of RNA Polymerase II, Directly Binds to Regulatory Elements of SUC2 and HXK2 Genes**Biochemical and Biophysical Research Communications. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.idealibrary.comon>>.

CHEN, J. et al. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. 2021.

CHENG, C. et al. Identification of Potential Target Genes for Adrlp through Characterization of Essential Nucleotides in UAS1. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 14, n. 6, p. 3842–3852, 1994.

CHIANG, Y. C. et al. ADR1 activation domains contact the histone acetyltransferase GCN5 and the core transcriptional factor TFIIB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 50, p. 32359–32365, 1996.

CHO, J.-I. et al. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v. 224, n. 3, p. 598–611, 2006.

COCCETTI, P.; NICASTRO, R.; TRIPODI, F. **Conventional and emerging roles of the energy sensor snf1/AMPK in saccharomyces cerevisiae** *Microbial Cell Shared Science Publishers* OG, 1 nov. 2018.

CONRAD, M. et al. **Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*** *FEMS Microbiology Reviews*, mar. 2014.

DE LA CERA, T. et al. Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: Implication in the glucose signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 3, p. 703–714, 2002.

DU, C. et al. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2845–2855, 15 mar. 2019.

ESCALERA-FANJUL, X. et al. **Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life** *Trends in Genetics* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2019.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, P. et al. Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 42151–42164, 7 dez. 2012.

GADURA, N.; ROBINSON, L. C.; MICHELS, C. A. Glc7-Reg1 phosphatase signals to Yck1,2 casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *saccharomyces* maltose permease. **Genetics**, v. 172, n. 3, p. 1427–1439, mar. 2006.

HAHN, S.; YOUNG, E. T. Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. **Genetics**, v. 189, n. 3, p. 705–736, 1 nov. 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. **Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today****Trends in Biotechnology**, dez. 2006.

HEBDON, S. D. et al. Genome-Wide Transcription Factor DNA Binding Sites and Gene Regulatory Networks in *Clostridium thermocellum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 2370, 7 set. 2021.

HIMMEL, M. E. et al. **Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective****ACS Symposium Series**, 1997.

HONG, S.-P. et al. **Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1533136100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1533136100)>.

HORÁK, J. **Regulations of sugar transporters: insights from yeast.****Current genetics**, 2013.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY**, v. 94, n. 1, p. 205–214, 2012.

JEFFRIES, T. W.; VAN VLEET, J. R. H. **Pichia stipitis genomics, transcriptomics, and gene clusters****FEMS Yeast Research**, set. 2009.

KANIAK, A. et al. Regulatory Network Connecting Two Glucose Signal Transduction Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 1, p. 221–231, fev. 2004.

KIM, J. H. et al. **The glucose signaling network in yeast****Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2013.

KUCHIN, S. et al. **Std1p (Msn3p) Positively Regulates the Snf1 Kinase in Saccharomyces cerevisiae.** New York: [s.n.].

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. 2012.

LIN, X. et al. Effects of *GLC7* and *REG1* deletion on maltose metabolism and leavening ability of baker's yeast in lean dough. **Journal of Biotechnology**, v. 209, p. 1–6, 10 set. 2015.

LONG, T. M. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492–5500, ago. 2012.

MARIANO, A. P. et al. Utilization of pentoses from sugarcane biomass: Techno-economics of biogas vs. butanol production. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 390–399, 2013.

NURCHOLIS, M. et al. Functional analysis of Mig1 and Rag5 as expressional regulators in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 395–410, 1 jan. 2019.

OSIRO, K. O. et al. Assessing the effect of D-xylose on the sugar signaling pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in strains engineered for xylose transport and assimilation. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 1, 1 fev. 2018.

PACHECO, T. F. A Importância da Produção de Etanol. 2011.

PAJAK, B. et al. **2-Deoxy-D-Glucose and its analogs: From diagnostic to therapeutic agents** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, 1 jan. 2020.

PALOMINO, A.; HERRERO, P.; MORENO, F. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 5, p. 1427–1438, 2006.

PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M.; GLIGORIS, T.; TZAMARIAS, D. The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. **EMBO Reports**, v. 5, n. 4, p. 368–372, abr. 2004.

PARIS. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. (org.). **Total CO2 emissions, World 1990-2019**. Disponível em: <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-browser?country=WORLD&fuel=CO2%20emissions&indicator=TotCO2>. Acesso em: 17 fev. 2022.

RAIJMAN, D.; SHAMIR, R.; TANAY, A. Evolution and Selection in Yeast Promoters: Analyzing the Combined Effect of Diverse Transcription Factor Binding Sites. **PLoS Computational Biology**, v. 4, n. 1, 2008.

RIBEIRO, L. E. et al. Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103624, dez. 2021.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. **Review of second generation bioethanol production from residual biomass***Food Technology and Biotechnology*University of Zagreb, , 1 abr. 2018.

RØDKÆR, S. V.; FÆRGEMAN, N. J. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 5, p. 683–696, 2014.

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 Microbiology**, v. 18, n. 1, 13 jul. 2018.

ROY, A. et al. Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt1. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 9, p. 1493–1503, 1 maio 2013.

SABINA, J.; JOHNSTON, M. Asymmetric signal transduction through paralogs that comprise a genetic switch for sugar sensing in *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 43, p. 29635–29643, 23 out. 2009.

SABIRE, Ö.; LEONG, T.; JOHNSTON, M. **Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a Key Regulator of Glucose-Induced Genes, Is both an Activator and a Repressor of Transcription***MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/mcb>>.

SARRIS, D.; PAPANIKOLAOU, S. **Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies***Engineering in Life Sciences*Wiley-VCH Verlag, , 1 maio 2016.

SCHMIDT, M. C.; O'DONNELL, A. F. **'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: mechanisms that suppress its toxic effects***Current Genetics*Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 fev. 2021.

SCHÜLLER, H. J. **Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae****Current Genetics*Springer Verlag, , 1 jun. 2003.

SHASHKOVA, S.; WELKENHUYSEN, N.; HOHMANN, S. **Molecular communication: Crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways***FEMS Yeast Research*Oxford University Press, , 1 jun. 2015.

SOUSA, F. et al. A IMPORTÂNCIA DO BIOETANOL DENTRO DO CONTEXTO BRASILEIRO, COMPARAÇÃO DE SUA SÍNTESE A PARTIR DE CANA-DE-AÇÚCAR E MILHO E BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO. 2019.

STASYK, O. G.; STASYK, O. V. Glucose sensing and regulation in yeasts. In: **Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application**. [s.l.] Springer International Publishing, 2019. p. 477–519.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

SUPRAYOGI et al. A *Kluyveromyces marxianus* 2-deoxyglucose-resistant mutant with enhanced activity of xylose utilization. **International Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 235–244, 2015.

TAYLOR, W. E. et al. **Designing Zinc-Finger ADRI Mutants with Altered Specificity of DNA Binding to T in UAS1 Sequences?***Biochemistry*. [s.l.: s.n.].

WESTHOLM, J. O. et al. Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3. **BMC Genomics**, v. 9, n. SUPPL. 2, 16 dez. 2008.

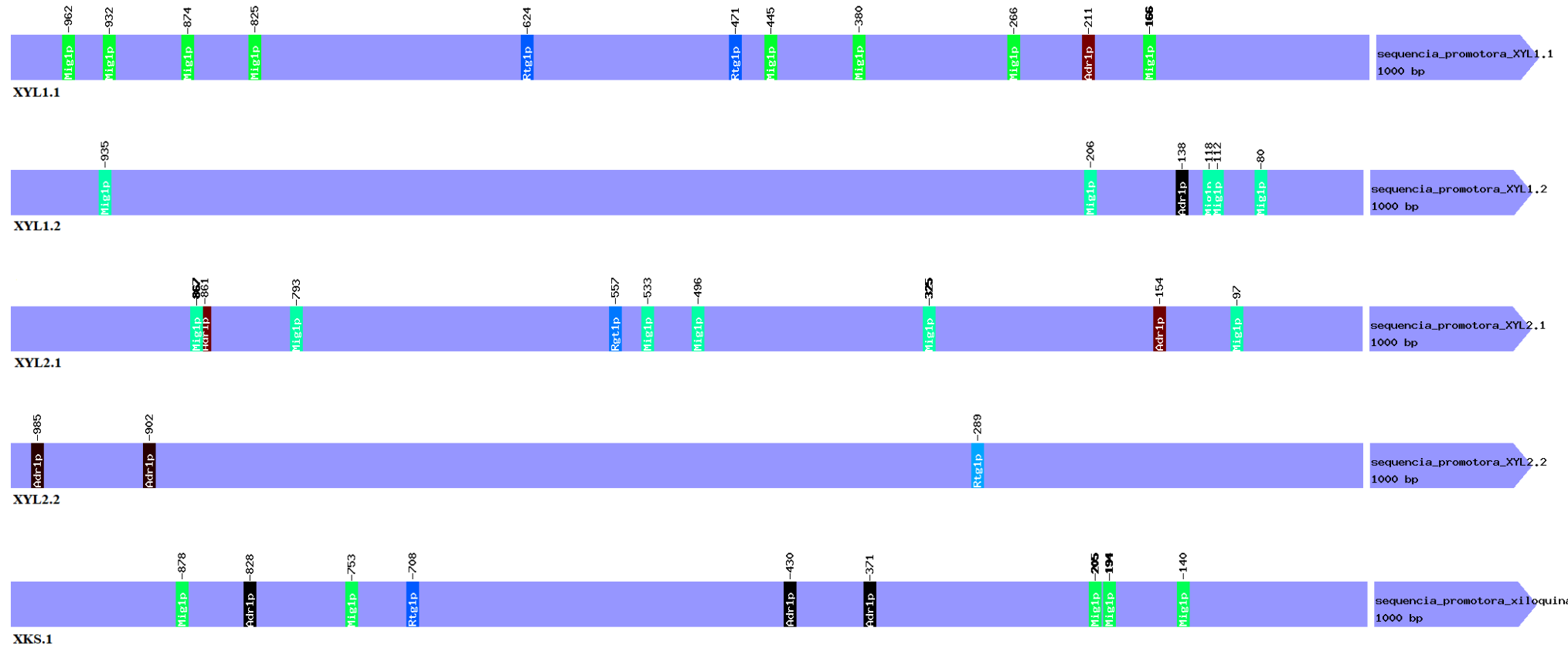
WILSON, W. A.; HAWLEY, S. A.; GRAHAME, D. **Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio**. [s.l.: s.n.].

WITTKOPP, P. J.; KALAY, G. **Cis-regulatory elements: Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence***Nature Reviews Genetics*, jan. 2012.

YOUNG, E. T. et al. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 26146–26158, 11 jul. 2003.

## Anexo 1

Posição dos *cis*-elementos nas regiões promotoras de XYL1.1/2, XYL2.1/2 e XKS



## Anexo 2

Vetor pLacZ (Clontech). Promotor: *cyc1*. Resistência: ampicilina. Marca de seleção: Ura3

