



Regulação fina da transcrição de *XKS1* através de promotores específicos para melhora do metabolismo da xilose em *S. cerevisiae*

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

Autores:

Brenda Cristina de Souza, IB - Unicamp

Beatriz de Oliveira Vargas, IB - Unicamp

Dr. Fellipe da Silveira Bezerra de Mello (coorientador), IB - Unicamp

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador), IB - Unicamp

INTRODUÇÃO:

Uma série de iniciativas tem se sucedido como tentativa de mitigar o impacto das emissões de combustíveis fósseis nas mudanças climáticas. Dentre esses esforços, a produção de etanol de segunda geração (E2G), a partir da conversão de resíduos lignocelulósicos agroindustriais sobressalentes a produção de etanol, que são ricos em xilose e glicose, tem sido apontada como uma alternativa atraente. A fermentação deste material é comumente realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua robustez industrial, com excelente capacidade fermentativa em condições semi-anaeróbicas, além da alta tolerância ao etanol [1]. Embora, não possua capacidade natural de metabolizar a xilose, é possível fazer uso de engenharia metabólica para inserir a via da xilose isomerase (**Figura 1**) nesta levedura, fornecendo assim a capacidade de metabolização da xilulose, produto isomerizado da pentose em questão [1].

Apesar dessa estratégia de modificação genética favorecer o consumo de xilose pela *S. cerevisiae*, a necessidade de uma melhoria neste metabolismo ainda se faz necessária para fins de aplicação comercial. Para tal finalidade, a modificação da taxa de transcrição de genes endógenos é comumente empregada, como a superexpressão do gene *XKS1*, responsável por codificar uma xiluloquinase, responsável pela conversão da xilulose em xilulose-5-fosfato que é naturalmente metabolizada na via das pentoses fosfato (PPP) [1] [2] [3]. Devido ao seu papel antecessor à PPP, a regulação do nível de expressão de *XKS1* é primordial para otimização da capacidade fermentativa de xilose em *S. cerevisiae*.

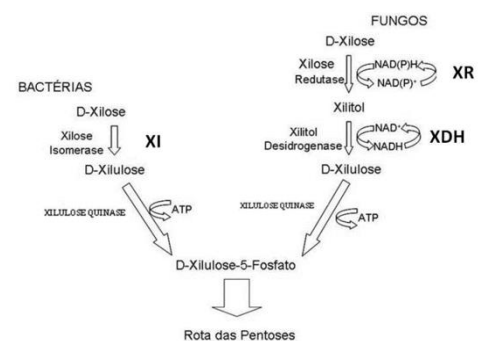


Figura 1 - Rotas de conversão de D-xilose em D-xilulose em bactérias e fungos.

A partir da análise do transcriptoma de uma levedura expressando uma xilose isomerase e outras modificações genéticas benéficas para o consumo de pentoses, durante uma fermentação em condições industriais de fermentação, é possível avaliar quais genes endógenos tem maior nível de expressão durante o consumo de xilose (**Figura 2**). A linhagem analisada é uma cepa industrial denominada Celere-2L, apresentando superexpressão de *XKS1* controlada pelo promotor *ADH1*. Com esse estudo, é possível avaliar que *ADH1* não apresenta maior expressão durante o consumo de xilose, enquanto os genes *TEF1* e *TDH1* - genes constitutivos cujos promotores geralmente são usados na construção de cassetes de expressão - se mostraram superiores. Sendo assim, o projeto em questão, objetiva o estudo dos promotores de *TEF1*, *PGK1* e *ADH1* para superexpressão do gene *XKS1* e seu efeito no metabolismo de xilose em *S. cerevisiae*, visando uma maior produção de etanol celulósico. Neste estudo, *GAP1p* será usado como controle negativo, devido ao seu baixo nível de expressão durante o consumo de açúcares.

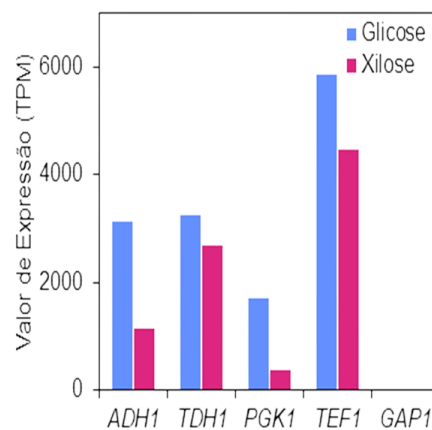


Figura 2 – Gráfico de expressão de genes chave na via glicolítica ou PPP cujos promotores podem ser usados para superexpressão de *XKS1*.

METODOLOGIA:

- **Linhagens e meio de cultivo**

A linhagem de *S. cerevisiae* laboratorial BY4742 (MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0) [4] será utilizada como background para teste da superexpressão de *XKS1* com diferentes promotores. A levedura será cultivada em YPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona e 20 g.L⁻¹ glicose) para fins de inóculo e propagação. YNB (6.7 g.L⁻¹ base nitrogenada para levedura) suplementado com 20 g.L⁻¹ glicose, CSM-L (500 mg.L⁻¹ dropout de aminoácidos sem L-Leucina). YNB 0.5% glicose 2% xilose CSM-U (500 mg.L⁻¹ dropout de aminoácidos sem Uracila) será usada em teste de fermentação. *Escherichia coli* DH5 α será usada para propagação e manutenção de vetores de expressão em levedura. Células DH5 α serão cultivadas em meio Luria Bertani (10 g.L⁻¹ triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio) adicionadas de 100 mg.mL⁻¹ de ampicilina para amplificação de plasmídeos. Em todos os casos, 15 g.L⁻¹ de ágar será adicionado ao meio para cultivo em meio sólido e glicerol 50% será adicionado 1:1 para armazenamento estoque a -80 °C.

• Biologia molecular geral

A transformação de levedura será realizada através do método PEG/LiAc, descrito por Gietz e cols. (2007) [5]. Transformação de células de *E. Coli* DH5 α será realizada pelo protocolo padrão de choque elétrico. Purificação de plasmídeos de bactéria será feito com um protocolo caseiro de miniprep. DNA genômico será extraído usando um protocolo rápido (LiOAc)-SDS/EtOH [6] para uso em reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as reações de PCR serão realizadas usando a polimerase de alta fidelidade Phusion® de acordo com as instruções do fabricante (NEB).

• Plasmídeos e clonagem

Para montagem dos cassetes de expressão de *XKS1* será usado o vetor p425-GDP [7] como *backbone* da estrutura necessária para replicação e manutenção do material genético. O vetor consta com um promotor *GAP1p*, flanqueado por sítios de restrição *SacI* a 5' e *BamHI* a 3', e terminador *CYC1t*. Para construção do cassete controle para teste de superexpressão de *XKS1*, *GAP1p-XKS1-CYC1t*, o vetor p425-GPD será digerido com *BamHI* e a ORF - amplificada do genoma de BY4742 com homologias externas ao sítio de digestão do backbone - será clonada a partir de transformação em *S. cerevisiae*. Para o cassete *TEF1p-XKS1-CYC1t*, *PGK1p-XKS1-CYC1t* e *ADH1p-XKS1-CYC1t*, p425-GDP será digerida com *SacI* e *BamHI* para remoção de *GAP1p*, e *TEF1p*, *PGK1p*, *ADH1p* e *XKS1* (também amplificadas a partir do genoma de BY4742) serão clonadas também via recombinação homóloga em levedura (**Figura 3**). Uma xilose isomerase funcional de *Orpinomyces* será expressa em vetor (pXI) contendo o gene e marcador de seleção *URA3*.

• Validação dos fenótipos

Cepas com superexpressão de *XKS1* e expressando pXI serão avaliadas de acordo com sua produtividade e rendimento de etanol em fermentação semi-anaeróbica. Cultivos serão realizados em garrafas do tipo Shott de 100 mL contendo 80 mL de meio YNB 0.5% glicose 2% xilose CSM-U, com uma densidade ótica inicial (DO600) de 1.0, 30 °C e 100 rpm. A quantificação dos açúcares consumidos e metabólitos produzidos será feita em análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

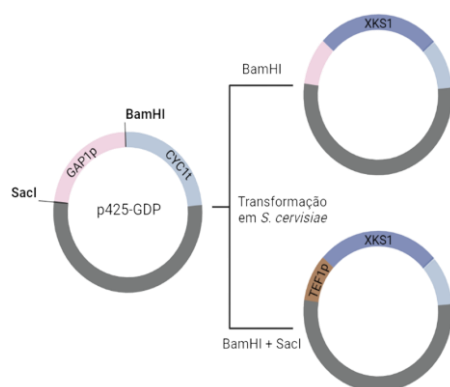


Figura 3 – Clonagem do gene *XKS1* no vetor p425- GDP a partir de duas estratégias: manutenção do promotor original do vetor (*GAP1p*) via linearização com enzima *BamHI* e posterior clonagem da ORF; remoção do promotor *GAP1* e substituição pelo *TEF1p*, via digestão com *BamHI* e *SacI*, simultaneamente

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inicialmente, foi realizada a linearização do vetor *p425-GPD*, para montagem do cassete de expressão *GAP1p-XKS1-CYC1t*, com a finalidade de usá-lo como controle negativo, visto a expressão baixado promotor *GAP1p* durante o consumo de xilose, e uma digestão de forma a extrair a sequência endógena de *GAP1p* do *backbone*, permitindo a construção dos cassetes *TEF1p-XKS1-CYC1t*, *ADH1p-XKS1-CYC1t* e *PGK1p-XKS1-CYC1t*. Também foi realizada a amplificação das sequências *TEF1p*, *PGK1p*, *ADG1p* e *XKS1* do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. A montagem dos vetores de expressão foi feita por clonagem in vivo em levedura, juntamente com um plasmídeo de *Orpynomices sp.* contendo uma xilose isomerase (*GAP1p-XYLA-CYC1t*, *URA3*), usando a linhagem BY4742 (**Figura 4**).

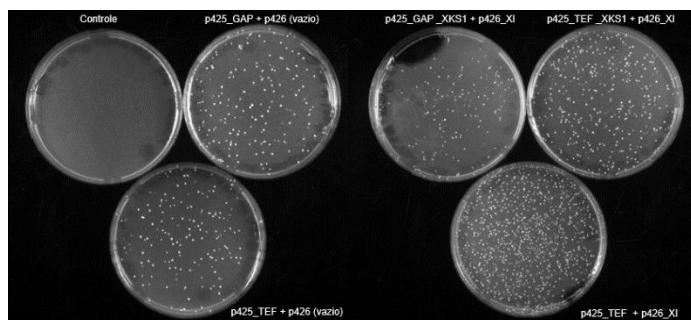


Figura 4: Placas de YNB sem leucina e sem uracila com leveduras transformadas de BY4742 para montagem dos vetores de interesse. Transformação pelo método PEG/LiAc, com controle negativo, integração de *p425_TEF1p + p426_GPD*, *p425_TEF1p + p426_XIOrp*, *p425_GAP1p + p426_GPD*, *GAP1p_XKS1 + p426_XI* e *TEF1p_XKS1 + p426_XIOrp*.

Após a confirmação das clonagens, os DNAs dos novos vetores foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α para amplificação e reconfirmação da clonagem por digestão. Após a constatação de que a construção das cepas foi bem sucedida (**Figura 5**), os materiais foram enviados para sequenciamento Sanger e o processo de validação do fenótipo foi iniciado. Todas as cepas transformadas foram utilizadas para fermentação de xilose em meio YNB URA-LEU- contendo 2% de xilose, seguidas de uma análise por HPLC.

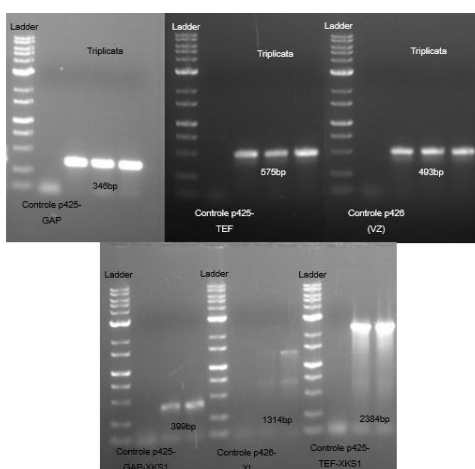


Figura 5: Gel de eletroforese das reações de PCR de confirmação da transformação em levedura para integração dos plasmídeos contendo os cassetes de expressão previamente montados e a via de xilose isomerase. PCR de confirmação da integração dos plasmídeos *p425_TEF1p + p426_GPD*, *p425_TEF1p + p426_XIOrp*, *p425_GAP1p + p426_GPD*, *GAP1p_XKS1 + p426_XIOrp* e *TEF1p_XKS1 + p426_XIOrp*.

CONCLUSÕES:

Após confirmação da montagem dos vetores contendo os diferentes cassetes de expressão de *XKS1*, e transformação da cepa com uma xilose isomerase, uma fermentação preliminar foi realizada para validar os fenótipos de consumo de xilose. Uma análise por HPLC do ensaio de fermentação confirmou que o promotor *TEF1p* foi capaz de aumentar significativamente o fenótipo de fermentação de xilose em *S. cerevisiae* em contraste com os outros promotores testados. Portanto, esses resultados podem contribuir para o desenvolvimento de cepas mais eficientes na fermentação durante a produção de E2G.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Wahlbom, A. Eliasson, and B. Hahn-Hägerdal, "Intracellular fluxes in a recombinant xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 72, pp. 289–296, Mar. 2001, doi: 10.1002/10970290(20010205)72:33.0.CO;2-9.
- [2] Y. Jin, H. Alper, Y. Yang, and G. Stephanopoulos, "Improvement of Xylose Uptake and Ethanol Production in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an Inverse Metabolic Engineering Approach," vol. 71, no. 12, pp. 8249–8256, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.12.8249.
- [3] L. Vieira et al., "Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains," *Nat. Publ. Gr.*, no. November, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1038/srep38676.
- [4] F. B. Pereira, D. G. Gomes, and A. Teixeira, "Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae*," pp. 45–53, 2012, doi: 10.1007/s10529-0110735-0.
- [5] M. R. J. Bothast, "Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol," pp. 19–25, 2005, doi: 10.1007/s00253-004-1819-8.
- [6] F. Mello, A. Coradini, P. Tizei, M. Carazzolle, G. Pereira, and G. Teixeira, "Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain," *Biomass and Bioenergy*, vol. 120, pp. 49–58, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.biombioe.2018.10.019.
- [7] L. M. Carvalho et al., "Understanding the differences in 2G ethanol fermentative scales through omics data integration," *FEMS Yeast Res.*, vol. 21, no. 4, May 2021, doi: 10.1093/femsyr/foab030.