
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

STELLA DIOGO CAVASSANA

**ANÁLISES FENOTÍPICAS DE ADAPTAÇÃO AO
ETANOL EM POPULAÇÕES EVOLUÍDAS DE
Saccharomyces cerevisiae PE-2**

STELLA DIOGO CAVASSANA

**ANÁLISES FENOTÍPICAS DE ADAPTAÇÃO AO ETANOL EM
POPULAÇÕES EVOLUÍDAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PE-2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas

Orientador: Dra. Ana Paula Jacobus

Coorientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Rio Claro - SP
2022

C377a

Cavassana, Stella Diogo

Análises fenotípicas de adaptação ao etanol em populações evoluídas de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 / Stella Diogo Cavassana. -- Rio Claro, 2022

59 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Ana Paula Jacobus

Coorientadora: Jonas Contiero

1. Biologia molecular. 2. Etanol. 3. Levedura. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

STELLA DIOGO CAVASSANA

**ANÁLISES FENOTÍPICAS DE ADAPTAÇÃO AO ETANOL EM
POPULAÇÕES EVOLUÍDAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PE-2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ana Paula Jacobus (orientadora)

Prof. Dr. Jonas Contiero (coorientador)

Prof. Dr. Henrique Ferreira

Prof. Dr. Jeferson Gross

Aprovado em: 07 de Janeiro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura da orientadora



Assinatura do coorientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a todas as forças espirituais que me guiam pelos melhores caminhos para que eu possa cumprir minhas missões nesta vida terrena. Junto a este agradecimento dedico este trabalho aos meus pais, os quais são a razão e o motivo para todas as realizações e conquistas da minha vida; o suporte material e emocional, este amor incondicional que vocês me dão é de valor inestimável e de total contribuição para que eu possa realizar tantos sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, Victor e Paula, pelo incentivo e pela vibração com cada uma de nossas conquistas, o amor que temos é mútuo e infinito.

Agradeço à minha orientadora Dra Ana Paula Jacobus e seu companheiro, meu também mestre, Dr. Jeferson Gross pela oportunidade de poder fazer parte do Laboratório de Genômica e Evolução Experimental de Leveduras. A generosidade, paciência que vocês tiveram comigo, que não tinha experiência nenhuma “na bancada” é uma grande inspiração da profissional que eu quero ser para meus colegas de profissão no futuro. Vocês me ensinaram não apenas as técnicas mas a viver a ciência, a pesquisa séria e fundamentada. Especialmente quero agradecer à Ana Paula por todo apoio, pelas nossas conversas diárias que ultrapassavam os limites da relação discente-orientadora; uma grande inspiração de profissional, de cidadã, de humanidade dentro da academia e jamais terei palavras para expressar minha gratidão e honra de ter convivido, aprendido e ter sido orientada por ti, muito obrigada por tudo e por tanto.

Aos meus amigos do Laboratório de Genômica e Evolução Experimental de Leveduras, Isabelle, Lucas, Yasmine, Dandara, Joneclei, nossa parceria na condução dos experimentos, nas trocas de conhecimentos e angústias da vida acadêmica foram fundamentais para entender que eu não estava sozinha nesta jornada dolorosa, mas deliciosa, que é ser estudante, pesquisador e cientista no Brasil. Aprendi muito e me diverti demais com todos.

Às minhas fiéis escudeiras da graduação, Gabriela, Jaqueline e Priscila, com todas nossas diferenças encontramos espaço para nos compreender, apoiar, brigar, fazer as pazes. Nós mudamos muito durante todos estes anos de amizade e acredito que tenha sido para cada vez melhor, nos tornamos mulheres de personalidade forte,

articuladas e independentes. Com vocês aprendi a ter relações profundas e verdadeiras de amizade e isso vou levar para o resto da minha vida.

Aos meus colegas de sala, ao Coletivo Mãe África, e a todos os amigos e amigas que fiz ao longo da graduação, me descobri entendendo os limites de quem eu sou e quem era cada um de vocês, onde nossas histórias se cruzavam e distanciavam. Em nossas brincadeiras, discussões e “balbúrdias” compreendi que umas das grandes diferenças das universidades públicas está no perfil de seus alunos, um perfil que é múltiplo, mas é coletivo acima de tudo. A Universidade pública está viva, e no que depender de muitos de nós, em nossa luta, ela continuará a ser espaço de inclusão de minorias, construção de pensadores, pessoas que mudarão a sociedade através de suas ações coletivas.

A todos os professores e professoras, este trabalho tem um pouco de cada um de vocês e a vocês dedico todo meu respeito e honra por terem a coragem e a ousadia de compartilharem seus saberes.

RESUMO

O Brasil é maior produtor mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar, uma das commodities mais biotecnológicas dos últimos anos. Durante todo o processo de fermentação as células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) são expostas aos mais diversos agentes estressores, desde o tratamento ácido para a reciclagem das células ao próprio produto da fermentação, o etanol – um dos principais desestabilizadores da estrutura e função celular das leveduras. Neste sentido, a necessidade de cepas industriais mais tolerantes ao etanol e demais agentes estressores é de primordial importância para o aumento de rendimento da produtividade brasileira. Em um trabalho anterior, quatro populações de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 foram submetidas a cerca de 70-80 choques de 19% a 30% (v/v) de etanol. O sequenciamento genômico das linhagens adaptadas revelou 67 mutações, das quais 22 foram escolhidas para serem estudadas em relação à adaptação das leveduras evoluídas ao etanol. No presente projeto propomos um estudo fenotípico das populações evoluídas obtidas no experimento anterior e uma análise individual das mutações mais importantes encontradas no sequenciamento genômico. Técnicas de engenharia molecular foram utilizadas para inserir no *background* do parental os alelos mutantes encontrados e foram estudados os efeitos adaptativos de cada mutação. Análises comparativas entre as populações evoluídas e mutantes em relação ao parental incluíram ensaios de crescimento em meio contendo etanol e ensaios de competição (progenitor versus evoluídos) monitorado por citometria de fluxo. O conhecimento obtido a partir deste estudo poderá contribuir para a engenharia racional de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que seja mais tolerante ao etanol sem perder sua performance fermentativa.

Palavras-chaves: Biologia molecular. Etanol. Levedura.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of ethanol from sugarcane, one of the most biotechnological commodities in recent years. During the entire process of fermentation yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) are exposed to various stressing agents, from acid treatment to recycling cells to the fermentation product itself, ethanol – one of the main destabilizers of yeast cell structure and function. In this sense, the need for industrial strains more tolerant to ethanol and other stressors is of paramount importance for increasing the performance of the Brazilian productivity. In a previous work, four populations of *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 were subjected to 70-80 shocks of 19% to 30% (v/v) ethanol. Genomic sequencing of the adapted strains revealed 67 mutations, of which 22 were chosen to be studied in relation to the adaptation of to ethanol. In this project we propose a phenotypic study of evolved populations obtained in the previous experiment and a individual analysis of the most important mutations found in the genomic sequencing. Molecular engineering techniques were used to insert into the parental background the mutant alleles found and the effects of each mutation were studied. Comparative analyzes between evolved populations and mutants relative to the parent included growth assays in medium containing ethanol and competition assays (parent versus evolved) monitored by flow cytometry. The knowledge obtained from this study may contribute for the rational engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain that is more ethanol tolerant without losing its fermentative performance.

Keywords: Molecular biology. Ethanol. Yeast.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 O processo de fermentação e as leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.2 Agentes estressores	12
1.3 Respostas adaptativas ao estresse	14
1.4 Escolha de cepas industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.5 Evolução experimental e engenharia genética para melhoramento da cepa industrial PE-2	18
2. OBJETIVO GERAL	22
2.1 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Extração do DNA genômico	23
3.2 Construção <i>in vivo</i> do cassete de integração e engenharia reversa das mutações	23
3.3 Engenharia reversa das mutações via clonagem <i>in vivo</i> e Crispr/Cas9	27
3.4 Diploidização	28
3.5 Inserção de GFP no parental diplóide H4	29
3.6 Ensaios de crescimento celular - TECAN	32
3.7 Ensaios de competição - citometria de fluxo	33
<i>3.7.1 Ensaios de competição em crescimento contínuo em meio contendo 0% e 8% de etanol</i>	33
<i>3.7.2 Competição em choques de etanol</i>	35
3.8 Cálculo do número de gerações e coeficiente de seleção/<i>fitness</i>	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Engenharia reversa das mutações via inserção de cassete KanMX e Crispr/Cas9	37
4.2 Diploidização dos parentais, mutantes e populações evoluídas	41
4.3 Inserção de GFP no parental diploide H4	42
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Na década de 1970, em meio ao embargo econômico imposto pelos países árabes, o mundo se viu diante da primeira crise do combustível fóssil de maior uso até então: o petróleo. Os preços do óleo dispararam e ficou economicamente inviável, fazendo com que o foco das discussões internacionais se voltasse para o ambientalmente sustentável. Pela primeira vez se discutia a necessidade de alternativas para fontes energéticas não apenas financeiramente atrativas como também renováveis e menos poluentes em relação ao petróleo. (GOLDEMBERG, 2007). Neste cenário, em 1975, o governo federal do Brasil criou o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), uma estratégia para fugir da dependência do petróleo e que, por meio de subsídios, estimulava a produção de etanol nas destilarias, em escala industrial, para consumo interno e externo. Os subsídios incluíam isenções de taxas e impostos para construção de novas refinarias, manutenção do preço de venda do etanol abaixo do preço da gasolina e acordos com companhias automobilísticas para a produção de carros *flex* movidos 100% a etanol. (BASSO *et al.*, 2011).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de bioetanol a partir da cana-de-açúcar; dados da Companhia Nacional de Abastecimento indicam que em 2020 o país bateu o recorde de produção, gerando 34 bilhões de litros de etanol de primeira geração provenientes desta matéria prima (PAÍS, 2020). Este biocombustível tornou-se a commodity biotecnológica mais importante dos últimos tempos, contribuindo para a garantia de fontes renováveis e limpas de energia e a geração de novos postos de trabalho associados à agricultura industrial. (STANLEY *et al.*, 2010). O etanol brasileiro é altamente competitivo - economicamente e ambientalmente - em relação aos demais combustíveis do mercado, pois apresenta menor custo de produção, maior produtividade por hectare de cana-de-açúcar plantado e maior percentagem de redução de emissão de gases poluentes. (GAROMA *et al.*, 2012).

Quando comparado a outras matérias-primas para fermentação como o milho, utilizado nos Estados Unidos, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) tem uma produtividade de biomassa muito maior, uma vez que é possível atingir 80-120 toneladas de cana/ hectare que geram 8.000 litros/hectare, enquanto o milho rende apenas 20 toneladas/ hectare e gera apenas 3.000 litros de etanol/ hectare. Além

disso, os açúcares provenientes da cana são encontrados nas formas simples como sacarose, glicose e frutose que podem ser fermentados diretamente pelas leveduras sem a necessidade de tratamentos de hidrólise prévios, como ocorre com o amido proveniente do milho; isso torna o processo industrial norte americano mais custoso e demorado em relação ao brasileiro. A natureza do solo fértil também fornece mais uma vantagem econômica e ambiental à produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar: a presença de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio que tornam dispensável a suplementação com nitrogênio químico – de elevado custo e que utiliza combustíveis fósseis como fonte de energia em sua produção. (BASSO *et al.*, 2011).

A prensagem da cana de açúcar gera o caldo de cana, que passa por um processo de clarificação, seguido de concentração por evaporação que resulta na formação de uma mistura de duas fases: uma parte líquida formada pelo melaço e outra sólida que consiste em cristais de sacarose formados durante a evaporação. Os cristais são retirados por meio de centrifugação e o líquido viscoso, o melaço – composto por 45-60% de sacarose e 5-20% de glicose e frutose - é utilizado como parte do substrato que será fermentado pelas leveduras. (BASSO *et al.*, 2011). Na maioria das destilarias o substrato consiste de uma mistura de diferentes proporções do caldo de cana com o melaço, enquanto o melaço supre as deficiências nutricionais apresentadas pelo caldo de cana, o caldo por sua vez não apresenta tantos compostos inibitórios as leveduras fermentadoras.

1.1 O processo de fermentação e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentação do etanol, em escala industrial, é um bioprocesso realizado por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que, em condições anaeróbicas, transformam metabolicamente os açúcares fornecidos pelo substrato (caldo e melaço) em etanol (C_2H_6O) e gás carbônico (CO_2), além de ácidos orgânicos e glicerol. (VENTURINI FILHO, 2010). Inicialmente, a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose pela ação da enzima sacarase ou invertase, e seguem para a glicólise onde serão convertidas em duas moléculas de piruvato. Por conta do bloqueio do ciclo de Krebs devido à ausência de oxigênio, o piruvato segue pela rota fermentativa, onde a enzima piruvato descarboxilase realiza a descarboxilação da molécula, resultando na produção de duas moléculas de CO_2 e duas de acetaldeído. Por fim, as moléculas de

acetaldeído são convertidas em duas moléculas de etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase. (MADIGAN *et al.*, 2010).

A metabolização do açúcar pelas leveduras tem como objetivo a geração de energia na forma de ATP, permitindo o uso posterior dessa fonte de energia química para a realização de funções fisiológicas e de biossíntese celular. O etanol e o CO₂ são apenas subprodutos da excreção, sem utilidade metabólica para a célula. (LIMA *et al.*, 2001).

O método de fermentação mais utilizado nas destilarias brasileiras é o de batelada alimentada com reciclagem de células, também chamado de método Melle-Boinot - patenteado em 1937 por Firmino Boinot na região de Melle, na França. (AMORIM *et al.*, 2011). O método é composto por três fases: a batelada alimentada, de baixo custo de manutenção em relação à batelada contínua; reciclagem das células de leveduras; e, por fim, o tratamento ácido das células recicladas antes de sua reutilização no próximo ciclo de fermentação. (DELLA-BIANCA *et al.*, 2013).

O processo industrial é feito em tanques de 300 a 3.000m³ onde se adiciona um inóculo de leveduras que é preparado misturando-se 2-12 toneladas de leveduras de panificação (baker yeast) com 10-300kg de leveduras selecionadas. Este inóculo representa 25-30% do volume total, que é completado com a adição da mistura do caldo clarificado e melaço preparados anteriormente. Durante todo o processo, a temperatura é mantida entre 32-35°C, mas a temperatura no interior dos tanques pode chegar à 40°C nas estações mais quentes do ano. (BASSO *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2011).

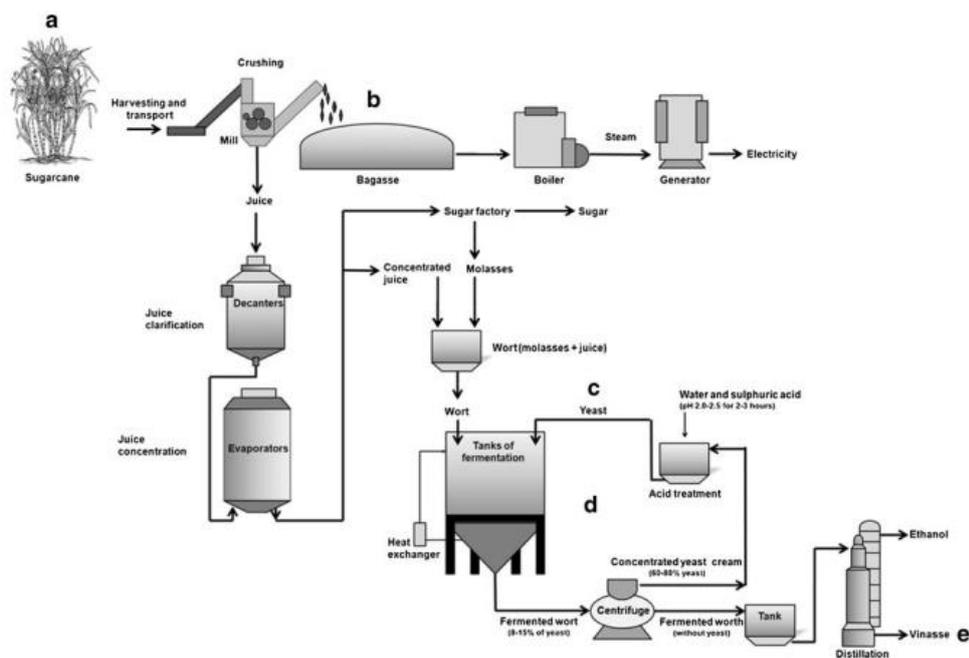


Figura 1. Método fermentativo com reciclagem de células Melle-Boinot. Fonte: AMORIM *et al*, 2011.

Essa grande massa de leveduras é responsável pela redução do tempo de duração do processo que, no caso brasileiro, leva de 6-12h, resultando em uma titulação de etanol de 8-12% (v/v). Ao final de cada ciclo as células de levedura são centrifugadas - formando um “creme de leveduras” - e submetidas a um tratamento ácido com o intuito de diminuir a contaminação bacteriana. Este tratamento consiste na diluição do creme de leveduras em uma mistura de água e ácido sulfúrico (pH 1.8-2.5) na proporção 1:1, durante 2h; posteriormente estas células são utilizadas para um próximo ciclo fermentativo, o que reduz a necessidade de propagação de leveduras entre os ciclos. A etapa de reciclagem e tratamento ácido são peculiares do processo de fermentação industrial brasileiro e acontece, pelo menos, 2x ao dia durante um período de 200-250 dias de fermentação. (BASSO *et al.*, 2011).

1.2 Agentes estressores

O ambiente dentro das dornas onde ocorre a fermentação é altamente estressor para as leveduras; são sequenciais condições em que altas concentrações de etanol, alta pressão osmótica, baixo pH, alta temperatura e outros compostos tóxicos contaminantes ou gerados no processo prejudicam as funções fisiológicas dos

microorganismos fermentadores, levando a diminuição da produtividade de etanol. (BASSO *et al.*, 2011; STANLEY *et al.*, 2010). Além disso, essas condições de estresse são potencializadas com a prática da reciclagem celular e as contaminações bacterianas que ocorrem no ambiente não-estéril das dornas.

O etanol, quando em grandes concentrações no meio extracelular, é capaz de penetrar a bicamada fosfolipídica das células da levedura e se instalar na região hidrofóbica; seu alojamento afeta as interações de hidrogênio que ocorrem entre os ácidos graxos insaturados e as proteínas que compõem a membrana. Os efeitos inibitórios são iniciados a partir da desestabilização da integridade da membrana celular, que se torna mais fluida e perde o potencial eletroquímico. Com isso, ocorre a entrada de diferentes espécies iônicas que causam acidificação intracelular e vacuolar, desnaturação proteica e diminuição do consumo de aminoácidos, minerais e carboidratos essenciais para as manutenções das funções metabólicas. (MA & LIU, 2010). Quando comparada com os demais microorganismos fermentadores, a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta a maior tolerância ao etanol. A concentração máxima de etanol no meio que permite o crescimento normal da levedura é de 10% (v/v), acima desta concentração os efeitos inibitórios já começam a ser observados. (DORTA, 2006).

Em relação ao pH, o crescimento ideal das leveduras ocorre numa faixa de pH entre 4,0 e 5,0, no entanto, a fermentação alcoólica ocorre numa faixa de pH abaixo deste ideal, mantendo-se entre 3,0 e 4,0. Este pH ácido do meio não é corrigido ao longo do processo de fermentação e serve para dois objetivos: restringir o crescimento exacerbado das leveduras no meio, o que faria com que parte dos açúcares fornecidos fossem desviados para formação de glicerol; outro objetivo é conter possíveis contaminações bacterianas que são comuns no processo devido a assepsia do sistema. (LIMA *et al.*, 2011). Porém, em pH muito ácido (próximo a 2,0), ácidos orgânicos não ionizados são capazes de penetrar na célula com maior facilidade causando a perda de minerais importantes como N, P, K, Mg e gerando redução da viabilidade celular e da produção etanólica.

A temperatura também é um agente estressor. As fermentações são reações exotérmicas e nos meses quentes do ano a temperatura no interior das dornas pode chegar até 40°C, enquanto a temperatura ideal de crescimento das leveduras situa-se entre 28°C e 32°C. As altas temperaturas contribuem para o aumento à

sensibilidade das células de levedura à toxicidade do etanol e levam a formação de metabólitos secundários como o glicerol, em resposta ao estresse.

Pelo fato de as fermentações serem feitas em tanques, com a manipulação de grandes volumes de substrato e toneladas de células de levedura, é muito difícil manter o meio estéril, o que possibilita a entrada de outros microorganismos contaminantes como bactérias e leveduras selvagens. (AMORIM *et al.*, 2011). As bactérias contaminantes geralmente são Gram-positivas, especialmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, provavelmente devido a maior tolerância a baixos valores de pH e altas concentrações de etanol. As contaminações bacterianas representam problemas durante o processo industrial pois consomem parte da matéria orgânica que seria utilizada para conversão em etanol pelas leveduras e produzem metabólitos (ácido láctico e acético) prejudiciais à performance fermentativa. (BASSO *et al.*, 2011). Além das bactérias, outras leveduras não-*Saccharomyces* e/ou linhagens de *S.cerevisiae* selvagens podem contaminar e dominar o meio. Este tipo de contaminação representa um grande problema à produção etanólica pois é de difícil controle devido à similaridade metabólica com as *S.cerevisiae* industriais selecionadas.

1.3 Respostas adaptativas ao estresse

Ao longo de sua evolução, as células eucarióticas desenvolveram mecanismos que permitissem sua adaptação e sobrevivência em diferentes condições ambientais estressantes. Como visto anteriormente, durante o processo industrial fermentativo, as leveduras são expostas a uma crescente série de agentes estressores que afetam principalmente as membranas e macromoléculas como lipídios e proteínas, cujas estruturas e funções são danificadas. As respostas a estes distúrbios são transitórias, consistem numa reprogramação das atividades celulares para assegurar a sobrevivência em condições adversas, proteger os componentes essenciais da célula e estar apta a voltar às funções celulares “normais” durante o período de recuperação. (STANLEY *et al.*, 2010).

De modo geral, ao serem submetidas à altas concentrações de etanol, as células de levedura apresentam inicialmente um aumento na expressão de genes envolvidos em rotas metabólicas que geram energia - como glicólise e funções

mitocondriais – e diminuição da expressão de genes relacionados ao consumo energético, o que explica a inibição do crescimento celular. Genes associados à funções vacuolares e de síntese de aminoácidos também têm sua expressão aumentada devido à necessidade de manutenção do pH e balanço iônico (STANLEY *et al.*, 2010); o mesmo aumento ocorre na expressão de genes que codificam a produção de macromoléculas estabilizadoras de membrana e proteínas desnaturadas. Neste sentido, a tolerância ao etanol é produto de uma ampla e complexa rede de interações entre genes e rotas metabólicas, uma vez que a desestabilização da membrana plasmática, causada pelo excesso de etanol, leva a uma cascata de efeitos celulares tóxicos e inibitórios agravados pelos demais agentes estressores.

Um fenômeno bem documentado na literatura e que explica parte do mecanismo de tolerância apresentado pela *S. cerevisiae* é o de proteção cruzada à múltiplos estresses. A proteção cruzada ocorre quando as células de levedura são expostas a um nível mediano (subletal) de determinado agente estressor para induzir sua tolerância e, quando posteriormente estas células são submetidas a outro tipo de estresse, apresentam maior resistência a ambos estresses. (STANLEY *et al.*, 2010). Costa *et al.*, 1993, demonstraram que leveduras que passaram por um choque térmico de temperaturas medianas apresentaram não apenas maior resistência à temperaturas mais altas como também ao etanol. Este fenômeno é uma evidência de que existem mecanismos de respostas gerais à estresses, independente do agente estressor inicial.

Um destes mecanismos de resposta geral contra estresse ocorre por meio da via de sinalização cAMP-PKA. Em *Saccharomyces cerevisiae* esta rota, mediada pelos níveis de AMP cíclico (cAMP), é responsável pelo controle do metabolismo, da resistência à estresse e do ciclo de crescimento celular (THEVELEIN & de WINDE, 1999). O cAMP é sintetizado pela enzima adenilato ciclase, que por sua vez é ativada pelas proteínas Ras quando há acidificação intracelular, e/ou pelo sistema de receptores acoplados às proteínas G (proteínas Gpr1p e Gpr2p) quando há excesso de glicose no meio extracelular. Duas moléculas de cAMP são necessárias para ativar a holoenzima proteína quinase A (PKA), que exerce papel central na fosforilação de outras proteínas e enzimas que regulam os processos de crescimento, resposta ao estresse e metabolismo.

Quando ocorrem situações de estresse ou mutações que diminuem/inibem a atividade da via cAMP-PKA, ocorre a indução da expressão de genes de resposta a estresse através dos elementos STRE (*stress responsive element*). O elemento STRE é uma sequência consenso (AGGGG) que se liga a região promotora de diversos genes, induzindo sua expressão em resposta à estresse. O STRE se liga à região promotora dos genes com o auxílio das proteínas dedo de zinco Msn2p e Msn4p; em condições normais, essas proteínas encontram-se fosforiladas (pela ação da PKA) no citoplasma e em condições de estresse, encontram-se desfosforiladas no núcleo, onde irão mediar a ligação dos STRE nos genes.

A transcrição de fatores estabilizadores e/ou reparadores de proteínas desnaturadas, como a trealose e as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* -HSP), são as respostas gerais mais notáveis frente à diferentes agentes estressores (TROTT & MORANO, 2003). A trealose é um carboidrato estocado que previne o influxo de sais ao diminuir a permeabilidade da membrana afetada pelo etanol; este carboidrato de reserva forma pontes de hidrogênio entre seu grupo hidroxil com o grupo polar dos lipídeos, estabilizando a membrana. (DING *et al.*, 2009). Estudos mostram que na presença de etanol em altas concentrações, células incapazes de acumular trealose apresentaram baixas taxas de crescimento celular (MANSURE *et al.*, 1994; OGAWA *et al.*, 2000; KAINO & TAKAGI, 2008). Já as HSPs são proteínas que agem como chaperonas, auxiliando no processo de enovelamento de proteínas recém-formadas ou desnaturadas a fim de manter a funcionalidade apropriada. Estes dois fatores (trealose e HSPs) são comumente co-induzidos em resposta ao etanol, a trealose prevenindo a desnaturação proteica e estabilizando a membrana, seguida pelas HSPs promovendo o dobramento correto e funcional destas proteínas. (MA & LIU, 2010).

1.4 Escolha de cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae*

A escolha da *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo fermentativo padrão das destilarias se dá principalmente devido a sua alta tolerância ao etanol – até 10% (v/v) de etanol no meio - em relação aos outros microorganismos fermentadores. Para garantia de que o processo fermentativo seja realmente eficiente, as cepas de *S.cerevisiae* escolhidas devem apresentar outras características além de

uma tolerância maior que 10% (v/v) de etanol, como uma maior velocidade de fermentação, alta dominância, alta persistência, e que não flocule e não forme muita espuma. (Basso *et al.*, 2011). A velocidade de fermentação diz respeito à quantidade de açúcar consumido por uma determinada quantidade de leveduras em um certo intervalo de tempo, quanto maior essa velocidade, maior e mais rápida a produção diária de etanol, além de diminuir o risco de contaminação. (DELLA-BIANCA *et al.*, 2012).

Durante o processo, leveduras selvagens e outros microorganismos podem contaminar o meio e prejudicar a performance fermentativa das linhagens selecionadas de *S.cerevisiae* tanto pela produção de metabólitos tóxicos/inibitórios, como pelo desvio de parte dos açúcares que seriam convertidos em etanol. Por isso é importante a escolha de uma cepa que seja dominante – a taxa de crescimento da cepa selecionada que deve ser maior que a dos microorganismos contaminantes – e persistente – tenha capacidade de sobreviver aos múltiplos estresses e continuar viável – pois assim se mantém a dinâmica populacional mais constante possível, refletindo uma maior constância de produtividade de etanol.

Um estudo de Basso *et al.* (2008) foi realizado ao longo de 12 anos em busca de linhagens de *S. cerevisiae* que correspondessem a estes critérios de seleção para serem usadas como padrão na indústria. O pesquisador notou que as leveduras *baker* geralmente empregadas como inóculo inicial do processo eram rapidamente substituídas por linhagens selvagens de *S.cerevisiae* entre 20-60 dias. Após caracterização fisiológica, Basso *et al* (2008). isolaram algumas cepas, dentre estas a Pedra 2 (PE-2, isolada da usina da Pedra, no município de Serrana (SP)) que apresentou maior dominância em diferentes destilarias ao longo de todos os anos de pesquisa. A cepa PE-2 foi reintroduzida em 24 destilarias na década de 1990 e desde então é usada como uma das cepas industriais de referência no mercado. (PEREIRA *et al.*, 2011). Ela apresenta além de dominância, uma alta tolerância ao etanol chegando a 19% de etanol (v/v) ao fim da fermentação. Esta cepa ainda demonstra adaptações fisiológicas às condições estressantes como o acúmulo de altos níveis de trealose, refletindo um crescimento e viabilidade celular vigorosos em relação às demais cepas. (PEREIRA *et al.*, 2011).

1.5 Evolução experimental e engenharia genética para melhoramento da cepa industrial PE-2

Desde que foi feita a caracterização fisiológica da cepa PE-2, e com o advento de ferramentas como sequenciamento genético, diversos estudos se dedicaram a compreender os mecanismos genéticos das respostas adaptativas dessa cepa frente aos múltiplos estresses que é submetida. A partir deste entendimento é possível, por meio de engenharia genética, estimular ou inibir rotas metabólicas que sejam essenciais para o aumento de tolerância e viabilidade das cepas industriais. Estes estudos são de grande interesse para a indústria, pois uma maior resistência e viabilidade das células de levedura significa que estas preservariam sua performance, podendo ser reutilizadas no processo de reciclagem por mais ciclos e a produtividade de etanol seria maior sem a necessidade de aumento dos gastos com inóculos de levedura.

Existem diversas abordagens as quais podem ser utilizadas para mapear os genes essenciais nas rotas adaptativas de tolerância ao etanol que a cepa PE-2 apresenta. Uma destas abordagens são os experimentos de evolução adaptativa em que, populações clonais são submetidas as mesmas pressões seletivas, possibilitando o acúmulo de mutações benéficas entre gerações, até que a população final seja mais adaptada ao meio em relação a seu ancestral. Estes experimentos permitem não apenas desvendar as bases genéticas por trás das variações fenotípicas e de fitness, mas também qual a diversidade de rotas adaptativas e caminhos evolutivos podem ser tomados por populações isogênicas submetidas as mesmas condições – propriedade do processo evolutivo conhecido como contingência. (BLOUNT *et al.*, 2018). O método aplicado a microorganismos ainda apresenta a possibilidade da criopreservação de amostras em diferentes pontos do experimento, que posteriormente podem ser usados em ensaios de competição entre as populações evoluídas e o ancestral e na investigação do surgimento de mutações primordiais para a evolução daquele traço fenotípico.

Um estudo conduzido por Jeferson Gross no laboratório de Genômica e Evolução Experimental de Leveduras (IPBEN/ Unesp Rio Claro) aplicou um protocolo de evolução experimental em que quatro populações de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 foram submetidas a cerca de 70-80 choques de 19% a 30% (v/v) de etanol. Neste protocolo, após crescimento em meio YEP 2% glicose até a fase estacionária,

1ml de células de cada população foi submetido a um choque de 19% de etanol – concentração que causa 90% de letalidade celular no parental - por 2 horas a 32°C. Após as 2h de choque de etanol as células foram transferidas para um novo meio YEP 2% glicose sem álcool para recuperação e crescimento (2-4 dias) até a fase estacionária. Quando a população, após 3-5 ciclos de choques, apresentava crescimento até a fase estacionária em somente dois a três dias - indicando fácil recuperação pós-choque - o volume de etanol era incrementado. Cerca de 70-80 ciclos de choque/recuperação foram feitos, chegando a um aumento de etanol de até 29-30% v/v. A cada novo choque com incremento do volume de etanol, amostras de cada uma das populações foram criopreservadas em glicerol, o mesmo foi feito com os parentais e os evoluídos finais de cada população.

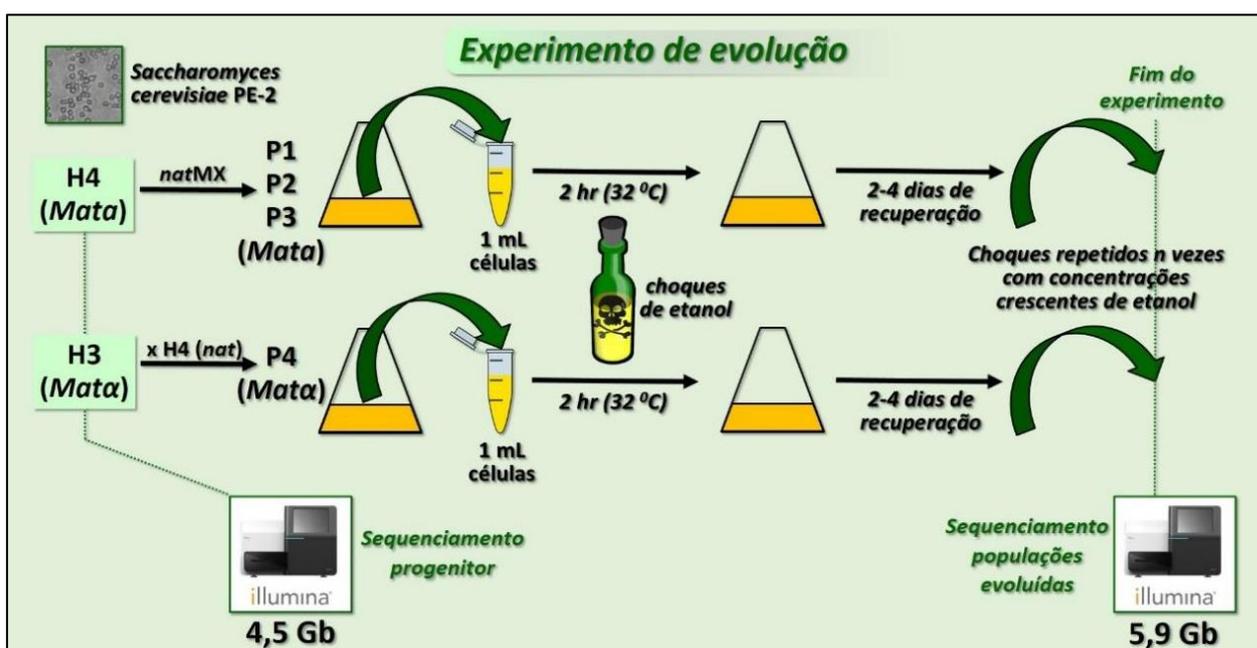


Figura 2. Experimento de choques de etanol com *S. cerevisiae* PE-2. O haploide H4 (*Mata*, natMX) originou as populações P1, P2 e P3. A marca de resistência a nourseotricina (natMX) foi passada para o *background* do haploide H3 (*Mata*) por cruzamento originando a população P4. Após crescimento em 20 mL (YEP 2% glicose) até a fase estacionária, 1 ml de células de cada população foi submetido a choque de 19% etanol por 2 horas a 32°C e depois transferido para 20 ml de meio YEP 2% glicose sem álcool para recuperação e crescimento (2-4 dias) até a fase estacionária. Cerca de 70-80 ciclos de choques/recuperação foram reiterados com um aumento de etanol de até 29-30% v/v. Incrementos no volume do etanol para o choque de uma dada população foram decididos quando, durante 3-5 ciclos de choques, essa população cresceu até a fase estacionária em somente dois a três dias, indicando fácil recuperação pós-choque. Os sequenciamentos genômicos finais são indicados.

Foi feito o sequenciamento genômico pelo método Illumina dos progenitores e dos evoluídos de cada população. Neste sequenciamento foram encontradas 67 mutações nos pontos finais da evolução em comparação com os parentais, das quais 22 mutações foram escolhidas para serem estudadas seguindo o critério de redundância das mutações – o mesmo gene aparece mutado em diferentes populações, ou genes diferentes da mesma rota metabólica se encontram mutados em diferentes populações.

Com o intuito de compreender em que momento ao longo do experimento de evolução as mutações surgiram e se estabeleceram nas populações, a partir das amostras congeladas foi feito o DNA genômico nos pontos inicial, ciclo 20, 40, 60 e ponto final da evolução. Estes DNAs extraídos serviram de *template* para reações de PCR com *primers* desenhados para flanquear as mutações; os produtos de PCR gerados foram purificados e submetidos a sequenciamento Sanger. O cromatograma (tabela 1) revela o ponto do experimento de evolução em que a mutação domina a população, como mostrado na figura e na tabela abaixo.

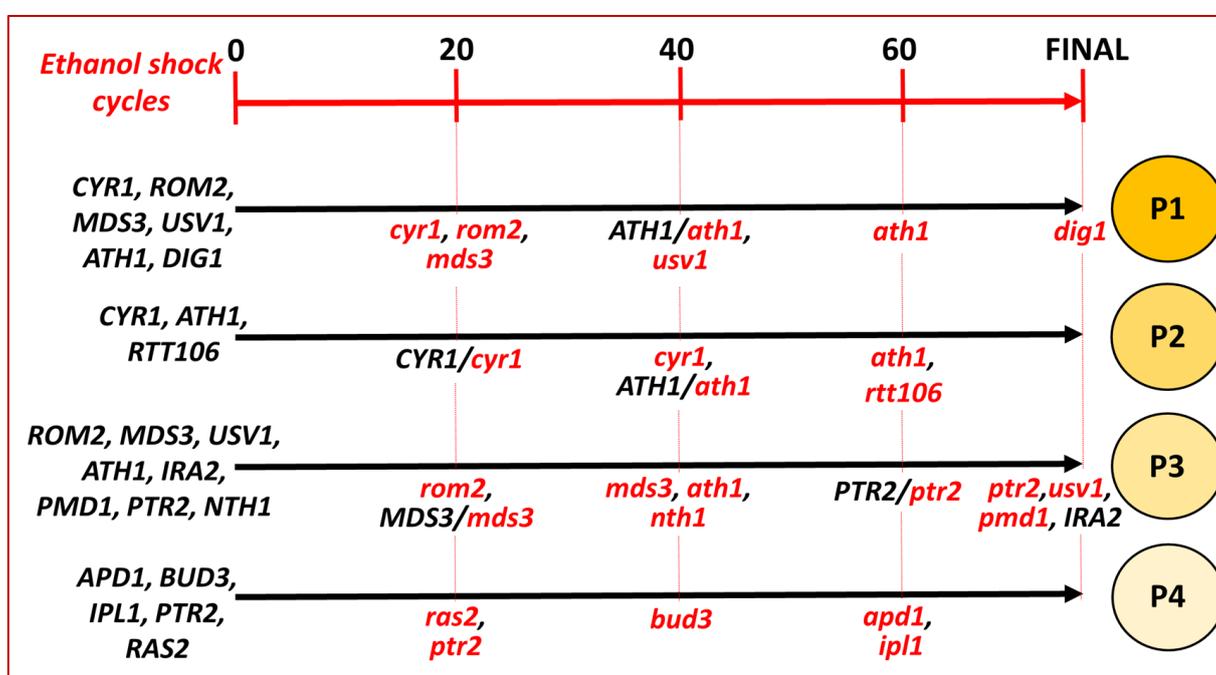


Figura 3. Esquema de aparecimento das mutações durante o experimento de evolução por choques crescentes de etanol em *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

Gene_ população afetados	Progenitor	Tratamento 20	Tratamento 40	Tratamento 60	Clone/População o Final
ATH1_P1	CAA_TTTTTTAC	CAA_TTTTTTAC	CAA_TTTTTTAC / (CAA_TTTTTTAC)	CAA_TTTTTTAC	CAA_TTTTTTAC
CYR1_P1	G	A	A	A	A
DIG1_P1	C	C	C	C	A
MDS3_P1	CATGGTTC	CATGGTTC (Ins)	CATGGTTC (Ins)	CATGGTTC (Ins)	CATGGTTC (Ins)
ROM2_P1	C	T	T	T	T
USV1_P1	C	C	T	T	T
ATH1_P2	CT_AAAAAACT	CT_AAAAAACT	A/_	CT_AAAAAACT	CT_AAAAAACT
CYR1_P2	G	G/T	T	T	T
RTT106_P2	AAAAAA	AAAAAA	AAAAAA	A_AAAAAA	A_AAAAAA
ATH1_P3	G	G	A	A	A
IRA2_P3	GGTTTTTTTGT				GGTTTTTTTGT (not mutated)
MDS3_P3	G	G/T	T	T	T
NTH1_P3	CCCCCC	CCCCCC	C_CCCCCCC	C_CCCCCCC	C_CCCCCCC
PMD1_P3	C	C	C	C	A
PTR2_P3	C	C	C	C/T	T
ROM2_P3	G	A	A	A	A
USV1_P3	G	G	G	G	T
APD1_P4	G	G	G	T	T
BUD3_P4	TTTTTT	TTTTTT	TTTTT_	TTTTT_	TTTTT_
IPL1_P4	CCTTTGT	CCTTTGT	CCTTTGT	inv(ACAAAGG)	inv(ACAAAGG)
PTR2_P4	T	G	G	G	G
RAS2_P4	A	T	T	T	T

Tabela 1. Ponto de prevalência do alelo mutado em relação ao curso do experimento de evolução com *S. cerevisiae* PE-2. Na primeira coluna são mostradas as populações experimentais P1 (azul), P2 (amarelo), P3 (bege) e P4 (lilás) e os nomes dos genes que apresentam mutações nas respectivas populações. As colunas que seguem representam em ordem e de forma simplificada o genótipo do progenitor e das populações nos ciclos 20, 40, 60 e no ponto final do experimento de evolução. O genótipo selvagem é representado em caracteres pretos e fundo verde, enquanto que a mutação em

caracteres vermelhos e fundo rosa. Em alguns casos, foi observado que o alelo mutante ainda não predominava na população no ciclo de tratamento amostrado. Neste caso, o fundo é representado em azul e o alelo selvagem e mutante são igualmente descritos na célula da tabela. A posição da mutação no gene em questão e o impacto sobre a proteína codificada não são mostrados.

2. OBJETIVO GERAL

Com o objetivo de compreender quais os efeitos adaptativos das mutações identificadas para o aumento de tolerância ao etanol, foi feita a engenharia reversa de cada um e/ou mais de um dos alelos mutados no *background* do parental haploide (H4). Os mutantes construídos e as populações evoluídas foram diploidizados e submetidas a uma série de ensaios de competição contra o parental para verificação dos efeitos fisiológicos adaptativos das mutações.

2.1 Objetivos específicos

- **Engenharia reversa dos alelos mutados no parental haploide H4**

Mutações que levam a quebra da fase de leitura, ou a stop códons prematuros, foram recapituladas por inserção disruptiva do gene pelo cassete de integração kanMX, especificando marca de resistência a geneticina. Algumas modificações genéticas, como modificação de aminoácidos ou proteínas codificadas, foram realizadas pelo sistema CRISPR/Cas9.

- **Marcação da linhagem parental com GFP**

Inserção do gene GFP no locus neutro *HO* do parental H4 via Crispr/Cas9. A linhagem *HO::GFP* foi usada como referência (i.e., linhagem “sensível”) em comparações com linhagens tolerantes em ensaios de competição.

- **Ensaio fenotípicos**

Os mutantes, as populações finais evoluídas e o parental foram diploidizados e submetidos a ensaios de crescimento celular em meio com 10% (v/v) de etanol por aproximadamente 24 horas. As leituras de densidade óptica (600nm) foram feitas a cada 15 minutos no leitor de microplaca TECAN e análises foram feitas pelo software Magellan. Por

meio de citometria de fluxo ensaios de competição foram feitos entre os mutantes e populações evoluídas contra o parental marcado com GFP. Análises foram feitas citômetro de fluxo Attune Nxt (Thermo Fischer).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico de *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*, foi extraído seguindo a técnica de extração com fenol/clorofórmio que faz uso de microesferas de zircônio para rompimento da parede celular, solução de lise (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl (de 5M estoque), 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0), fenol e clorofórmio, o qual permite que permite que contaminantes proteicos sejam desnaturados com partição dos mesmos na fase orgânica ou interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. Os ácidos nucleicos são precipitados com etanol absoluto, centrifugados e ressuspensos em água. Após são tratados com RNase A (15 min, 37°C), novamente passam pelo processo de extração com fenol/clorofórmio, centrifugados e, retirada a fase superior da partição, adiciona-se 50-100ul de solução de NaCl 5M e etanol absoluto para precipitar novamente o dna, centrifuga-se e lava-se o pellet com etanol 70% para retirar o excesso de sal, ressuspende-se em água, e procede-se a quantificação do Dna com o equipamento/kit Qubit (Invitrogen).

3.2 Construção *in vivo* do cassete de integração e engenharia reversa das mutações

Os cassetes de integração, que reproduzem os genes que sofreram mutações de perda de função, consistem de um cassete de marca de resistência à geneticina (KanMX) ou nourseotricina (NatMX) inserido entre dois fragmentos homólogos às regiões flanqueadoras do gene alvo, vide figura 3. Estes cassetes são construídos para os diferentes genes mutados pelo método de clonagem *in vivo* que ocorre em *E.coli* e, posteriormente, transformados no *background* do parental haploide H4.

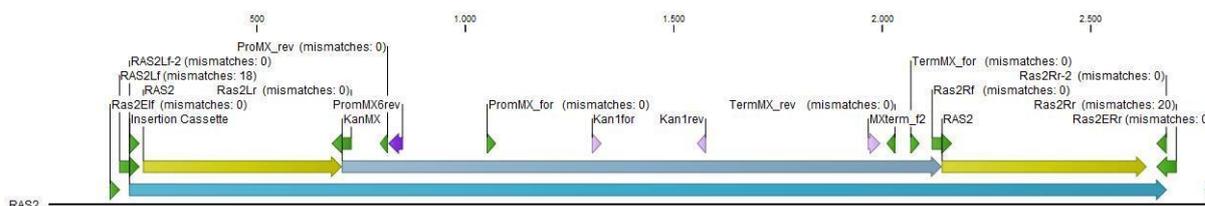


Figura 4. Representação gráfica da inserção do cassete de integração *RAS2::KanMX* no gene *RAS2*. O gene *RAS 2* de *S. cerevisiae* PE-2 é mostrado em close-up (barra azul abaixo); os fragmentos homólogos à região flanqueadora direita e esquerda do gene *Ras 2* (flancos em amarelo) são separados pelo cassete de geneticina *KanMX* (barra azul acima).

O cassete de geneticina (*KanMX*) foi amplificado do plasmídeo pUG6 através de uma reação de PCR utilizando os *primers* KanpB3for-5 e KanpB3rev-5. O cassete de nourseotricina (*NatMX*) foi amplificado do plasmídeo pAG25 com os *primers* ProMX2-f e Term MX-rev. Os fragmentos das regiões flanqueadoras direita (R) e esquerda (L) dos genes alvo das mutações foram amplificados através de reações de PCR utilizando o DNA genômico do haploide H4 como *template* e os respectivos pares de *primers* para cada um dos genes mutados. O vetor pUC 19 - utilizado como arcabouço para recombinação homóloga *in vivo* dos produtos de PCR - foi linearizado por meio de PCR com os *primers* PEcloner1for e PECloner1rev. Os fragmentos L e R dos genes gerados compartilham em uma das extremidades 20pb de homologia com o vetor pUC19 e em outra extremidade 5pb de homologia com o cassete de geneticina/nouserotricina. Deste modo, através da tecnologia de *in vivo* cloning, ao serem transformados em células competentes de *E.coli* (linhagem DH5 α), os produtos de PCR (cassete de antibiótico, fragmentos L e R do gene alvo e plasmídeo linearizado) sofrem recombinação homóloga entre si, resultando em um vetor fechado que contém o cassete de integração, como mostrado no exemplo da figura 4.

Primer	Sequência
ProMX2-f	GGTTAGGATTTGCCACTGAGGTT
Term MX-rev	CAGTATAGCGACCAGCATTACATAC
PEcloner1for	CCCAATACGCAAACCGCCTCTCCTGATTCACCCTCTGCAC
PEclones1rev	GGGACGAGGCAAGCTTGTC AAGCATTGAAACGTGCAAC

KanP3for-5	TAAAAGCTTGCCTCGTCCCCGCC
KanP3rev-5	TAGCTTCGACACTGGATGGCCGCGTT

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na construção dos cassetes de integração

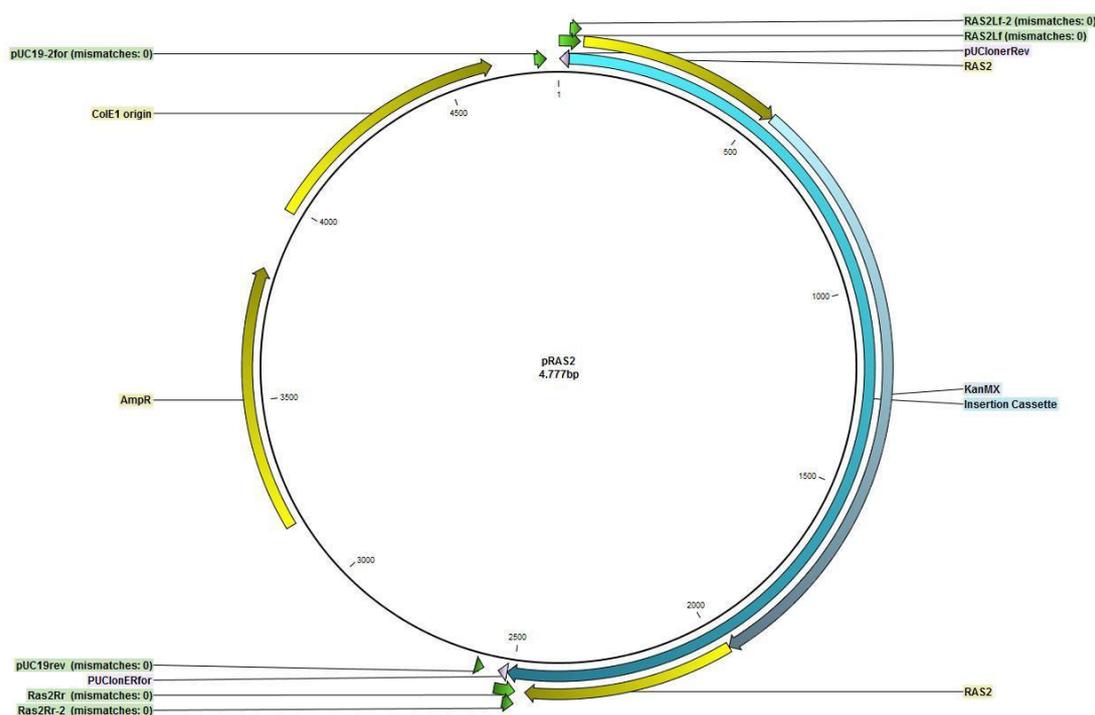


Figura 5. Representação do plasmídeo pRAS2 resultante da recombinação homóloga *in vivo* (*E. coli*) entre o plasmídeo pUC19 linearizado, fragmentos dos flancos L e R do gene *RAS2* e cassete de genética (KanMX). Uma vez montado, o plasmídeo pRAS2 passa por reação de PCR para retirada do cassete de integração e posterior transformação no parental haploide H4.

A cultura de células transformadas foi plaqueada em meio sólido LB e das colônias será extraído DNA plasmidial com o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). O DNA plasmidial foi submetido à uma reação de PCR com um par de *primers* que amplifica todo o cassete de integração e, após confirmação da montagem correta do cassete de integração, o produto de PCR foi purificado em coluna de sílica (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) e transformado diretamente no parental haploide H4

seguindo o protocolo de transformação de leveduras com acetato de lítio e choque térmico a 42°C por 45 minutos (GIETZ E WOODS, 2006).

As reações de PCR para clonagens foram realizadas com a Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). Os PCRs de diagnóstico, que confirmam a presença do cassete KanMX no locus gênico, foram realizados com a Taq DNA polimerase (ThermoFisher Scientific) e pares de *primers* (tabela 3) para cada mutante, sendo que um dos pares de *primers* combina um primer que flanqueia parte do locus gênico com outro primer que flanqueia parte do cassete de deleção (*primer* ProMXrev)/ região da mutação introduzida pelo sistema Crispr/Cas9, enquanto o controle negativo consiste em um par de *primers* que amplifica o locus gênico na sua versão *wild type* sem a mutação.

Primer	Sequência
ATH1diaF	CACGAAGGGATTGATGACGAGTA
ATH1diaR	CCAATGTCTGTTGCCCACTTTAG
MDS3diaF	GGATCTCAGCTTCGTCTTTACCA
MDS3diaR	CAAATCAGAAAGAGGCTTCCCG
USV1diaF	TATTAATAGCGGGAACATGCCGA
USV1diaR	ATCAGTGATTGGATGGGAAGGAA
NTH1diaF	GTAATCCCGATGCTGTGGATTTG
NTH1diaR	CCGTGTTTCGATGCATATGGTAG
RAS2diaF	AAAACAGGTCTCTTACCAGGACG
RAS2diaR	CATTTTTACCGTTGGCAGCATTG
ROM2P1for	ACAGCACCAACATCACCAGC
ROM2P1rev	TAGACGAGCTTCCCATAACAC
ROM2P3 for	GTAGAAGTAGTATGACACCTTTG
ROM2P3rev	GTGGATCATGGGCGTTTGTGG
PTR2for	CTGCTAAACCTTCCGTTTCATCC

PTR2P4rev2	ATCTTCTAATGAAAGGATATACG
HOdiaF	TCTCAGTAGATAGCTTGGGTCCT
HOdiaR	TCGCCGTACATAAATTCAGGGAT
ProMX_rev	CGACAGTCACATCATGCCCC

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos PCRs de confirmação da transformação com KanMX nos *locus* gênicos dos mutantes.

3.3 Engenharia reversa das mutações via clonagem *in vivo* e Crispr/Cas9

Para mutações pontuais como mudanças de aminoácidos e de proteínas codificadas, a engenharia reversa das mutações foi feita por meio da técnica desenvolvida em nosso laboratório que combina o sistema CRISPR/Cas9 com a clonagem/construção *in vivo* descrita por JACOBUS e GROSS (2015), que ocorre em *E.coli* e *S.cerevisiae*. A nossa técnica CRISPR/Cas9, baseada em construções *in vivo*, depende da expressão da proteína Cas9 a partir de um vetor separado do RNA guia (gRNA) que especifica o alvo genético da mutagênese. É justamente o vetor contendo o gRNA que é montado por métodos *in vivo*. O plasmídeo correspondente ao gRNA, foi amplificado utilizando *primers* universais que contém caudas especificando a sequência alvo CRISPR (20 nucleotídeos), e é idêntica ao *locus* onde se deseja a mutagênese. O produto de PCR (plasmídeo linearizado com caudas dos *primers*) foi transformado no parental H4 de *S.cerevisiae* onde, pela maquinaria celular de reparo de DNA, se fecha *in vivo* gerando um gRNA funcional.

“*Donors*” - isto é, fragmento de reparo que inserem a mutação no DNA do parental H4 - foram gerados por reações de PCR utilizando como *template* o DNA genômico extraído dos mutantes originais (retirados do experimento de evolução) e *primers* específicos para cada *locus*. Ao longo do experimento de evolução, como foi dito, amostras das culturas eram criopreservadas; após o sequenciamento foi possível identificar em que ponto do experimento de evolução surgiram estas mutações pontuais e, a partir daí, realizar a extração do DNA genômico dessas culturas. Desta forma, os produtos de PCR gerados consistem em fragmentos de DNA que contém a mutação pontual que se deseja recriar no parental haploide.

O experimento de mutagênese é completo quando são transformados na mesma célula (parental H4) que recebeu os plasmídeos especificando o gRNA, o plasmídeo contendo a sequência codificante da proteína Cas9 e mais o “*donor*” gerado por PCR. Na sequência do choque térmico, as células foram plaqueadas em meio sólido YPD 2% sacarose contendo os antibióticos para seleção dos plasmídeos especificando o gRNA e a Cas9. Após o crescimento das colônias as mesmas foram testadas por PCR e uma colônia positiva será posteriormente crescida em meio YPD 2% sacarose, 200 RPM, 30°C sem antibiótico por 5 dias consecutivos, trocando o meio de cultura diariamente para eliminação dos plasmídeos.

O método de transformação utilizado em todos os processos descritos foi o de Gietz e Woods (2006). As reações de PCR para clonagens foram realizadas com a Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs), PCRs confirmatórios foram realizados com a Taq DNA polimerase (ThermoFisher Scientific) e diferentes combinações de *primers* para cada mutação (tabela 6).

3.4 Diploidização

Após alguns ensaios fenotípicos com as linhagens evoluídas (P1, P2, P3 e P4), notou-se que a população P4 apresentou um fenótipo industrialmente de floculação, caracterizado pela agregação celular e rápida sedimentação no meio em condições adversas/estresse. Ao compararmos as células haplóides com as células diplóides dessa população, percebemos que estas últimas tinham uma marcada diminuição do fenótipo de floculação – fenômeno ainda pouco documentado na literatura. Para realizarmos os testes fenotípicos posteriores devemos evitar a floculação pois este fenótipo altera os resultados nas leituras de densidade óptica e citometria de fluxo, contando os agregados celulares como única célula. Optamos então por diploidizar todos os mutantes, populações evoluídas e o parental para realizar as avaliações posteriores.

A troca de *mating type*, necessária para reprodução sexuada/diploidização, é realizada pela atividade da endonuclease codificada pelo gene *HO*; no entanto, a linhagem PE-2 apresenta uma mutação neste gene, que o torna inativo – explicando o ciclo heterotático da cepa. Uma das maneiras de induzir uma linhagem heterotática a trocar de *mating type* é através da transformação de um plasmídeo (pSHO) contendo

a sequência da endonuclease HO nos haploides e posterior indução da troca em meio líquido contendo galactose 2%.

O protocolo utilizado para transformação do plasmídeo pSHO nos mutantes, populações evoluídas e parental é o de acetato de lítio e choque térmico de 42°C por 45 minutos (GIETZ E WOODS,2006). As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido YPD 2% glicose com zeocina – marca de resistência presente no pSHO – e incubadas a 30°C por dois dias. Posteriormente, as colônias formadas foram inoculadas em 20 mL de meio YP (20% extrato de levedura; 20% peptona) com 2% de galactose – a galactose induz a expressão do gene *HO* presente no plasmídeo – onde cresceu sob agitação de 200RPM, a 30°C por 24 horas. Após a indução pela galactose, a cultura foi plaqueada em meio sólido com zeocina e as colônias resultantes foram testadas em relação ao *mating type* através de reações de PCR com os pares de *primers* MAT paper e MAT A/MAT alpha.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
MAT paper	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
MAT alpha	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
MAT A	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG

Tabela 4 Oligonucleotídeos utilizados nos PCRs de confirmação da diploidização dos mutantes e populações evoluídas.

Após confirmação da mudança de *mating type* e diploidia, a curagem do plasmídeo foi feita através da inoculação da colônia positiva em meio 20 mL YPD 2% sacarose, onde cresceu a 200RPM, 30°C por 24 horas. Decorrido este tempo, 5 µL da cultura foi transferida para um novo meio onde cresceu por mais 24 horas sob as mesmas condições até que o plasmídeo fosse eliminado. A eliminação do plasmídeo foi confirmada através da ausência de crescimento de 20 µL da cultura em 20 mL YPD 2% sacarose com antibiótico zeocina ao longo de 3 dias de monitoramento.

3.5 Inserção de GFP no parental diplóide H4

Empregamos a técnica de Crispr/Cas9 para introduzir o gene da *GFP* no *locus HO* de *S.cerevisiae* (figura 5), uma vez que ele é inativo na linhagem PE-2 e a inserção

não representaria prejuízos à performance fermentativa. Inicialmente foram amplificados por PCR dois fragmentos com 40 pb de sobreposição entre si e homologia de 40 pb com os flancos esquerdo e direito do gene *HO*. O primeiro fragmento contendo o promotor *TEF1* foi amplificado do cassete *KanMX*, com os *primers* *tefGFP_f* e *tefGFP_r*. O segundo fragmento foi amplificado de um subclone contendo a região codificante da variante GFP mUkG1, com códon otimizado para expressão em *S.cerevisiae*, fusionada ao terminador do gene *TDH1* de *S.cerevisiae*. Este segundo fragmento foi amplificado com os *primers* *GFP_f* e *TDH1_r*.

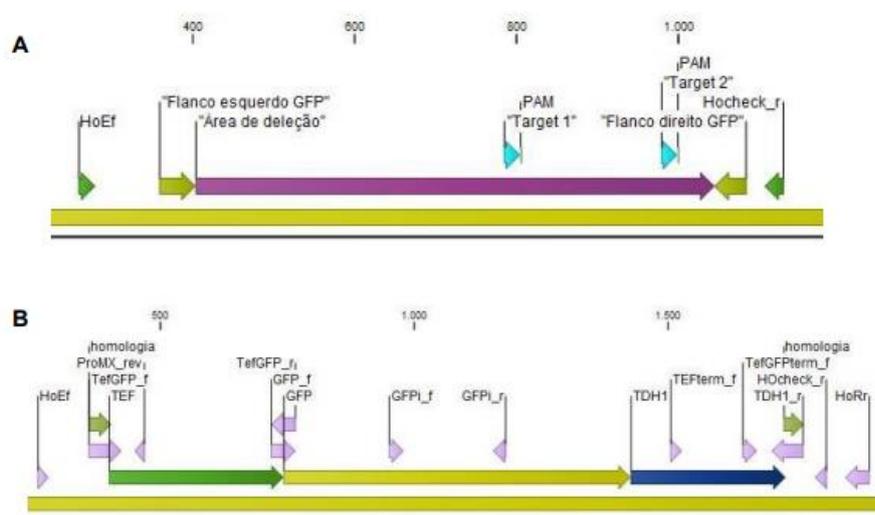


Figura 6. Representação gráfica do locus *HO* e do constructo GFP inserido. **(A)** O locus *HO* no cromossomo IV de *S. cerevisiae* PE-2 é mostrado em close-up (amarelo) indicando-se as regiões de recombinação com o constructo GFP (flancos em amarelo esverdeado) e a área de deleção após a inserção (em roxo). São mostradas em azul as sequências alvo de 20 nt (Target 1 e 2) para a clivagem com o sistema Crispr/Cas9. *Primers* para comprovação da inserção são demonstrados em verde. **(B)** O constructo GFP é mostrado inserido no locus *HO* (barra amarela em baixo). Ele contém o promotor pTEF (verde), a sequência codificante da GFP (amarelo) e o terminador tTDH1 (azul).

O plasmídeo (resistência à higromicina) correspondente ao gRNA, foi amplificado utilizando os *primers* *JacA_HO1* e *JacB_HO1*, os quais por recombinação montam um gRNA funcional que especifica o alvo da Cas9 no locus *HO*. O plasmídeo foi clonado *in vivo* no parental diplóide H4 por meio do método de transformação com acetato de lítio e choque térmico a 42°C por 45 min (Gietz e Woods, 2006). Após transformação e crescimento de colônias em meio sólido YPD 2% sacarose contendo higromicina, foi feito um *screening* por PCR de colônia com os *primers* *B_Jac* e *Or2_r*.

Uma colônia positiva para a presença do plasmídeo contendo o gRNA_HO1 foi colocada para crescer *overnight* e transformada no dia seguinte com os fragmentos 1 e 2 do constructo GFP gerados por PCR e um plasmídeo contendo o gene da Cas9. Os fragmentos neste caso servem como *donors* e recombinaem na região indicada pelo gRNA (*locus HO*) para ser cortada em dupla fita pela Cas9. Na sequência do choque térmico, as células foram plaqueadas em meio sólido YPD 2% sacarose contendo os antibióticos para seleção dos plasmídeos especificando o gRNA (higromicina) e a Cas9 (geneticina). Após o crescimento das colônias, as mesmas foram testadas com *primers* HoE_f e ProMX_r. Uma colônia positiva posteriormente foi inoculada em meio YPD 2% sacarose, 200 RPM, 30°C sem antibiótico por 5 dias consecutivos, trocando o meio de cultura diariamente para eliminação dos plasmídeos. Vários PCRs confirmatórios foram feitos com combinações de *primers* para autenticar a presença de todos os componentes do constructo *GFP* e que sua inserção no locus *HO* se deu como esperado.

Primer	Sequência
tefGFP_f	TTGATGGTAGAATAATAATAATTCCAAAAAAC CATCATAAGACATGGAGGCCAG AATACCCTCCTTG
tefGFP_r	CATTTCTTCTTTGATGACACTGACCATGGTT GTTTATGTTCCGGATGTGATGTGAG
GFP_f	CTCACATCACATCCGAACATAAACAACCATG GTCAGTGTCATCAAAGAAGAA
TDH1_r	CAATTCCGTCCATAATGGATGAATAAACAGT TTGAATTGCAAAGGCAGCAATATAT TGTTTACTTAT
JacA_HO1	CGCTGCGTGCCAAACATGTAGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG
JacB_HO1	TACATGTTTGGCACGCAGCGGATCATTATC TTTCACTGCGGAGAAGTTT CGAACGCC
B_Jac	GGCGTTCGAAACTTCTCCGCAGTGAAAGATA AATGATC
Or2_r	AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC

HoE_f	TTGTCAGTCAGGGTCCCTACC
ProMX_r	CGACAGTCACATCATGCCCC

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados na construção do GFP e posterior confirmação da inserção no locus HO.

3.6 Ensaios de crescimento celular – TECAN

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, ensaios de viabilidade celular a choques de 19% (v/v) de etanol demonstraram que a maioria das mutações não promove uma tolerância constitutiva ao etanol, na realidade esta tolerância depende de indução com choques de etanol prévios. Neste contexto, os ensaios de crescimento celular em meio com 10% (v/v) de etanol foram feitos após a pré-indução das células com dois ciclos de choques de 15% (v/v) de etanol e recuperação.

As células diplóides do parental, dos mutantes e das populações evoluídas foram colocadas para crescer em meio YPD 2% sacarose até atingir a fase estacionária (O.D > 1.5, comprimento de onda 600nm). 1mL da cultura é centrifugada e ao *pellet* de células foram adicionados 850 µL de tampão PBS mais 150 µL de etanol absoluto, e incubado por 2 horas a 32°C - constituindo o primeiro choque de etanol 15% (v/v). Após este período de incubação, as células foram peletadas por centrifugação, o sobrenadante descartado, e o *pellet* ressuspendido e transferido para 20mL de meio YPD 2% sacarose – fase de recuperação. O crescimento na fase de recuperação ocorreu até atingir a fase estacionária e posteriormente foi feito mais um choque de etanol 15% (v/v), 32°C por 2h, seguido de recuperação.

Atingida a fase estacionária após o segundo ciclo de choque-recuperação celular, as amostras de cada cultura foram inoculadas em poços de microplaca organizadas em dois grupos experimentais, um com 10% (v/v) ou mais e outro com 0% (v/v) de etanol no meio. O primeiro grupo experimental consiste na inoculação de 2 µL das células pré-induzidas em 178,2 µL de meio YPD 2% sacarose com 19,8 µL de etanol (10% v/v de etanol) por poço. O segundo grupo experimental consiste na inoculação, de 2 µL das células pré-induzidas em 198 µL de meio YPD 2% sacarose por poço. Cada amostra (parental, mutantes e populações evoluídas) foi inoculada, no mínimo, em triplicata nos poços da microplaca; um grupo controle (sem células, apenas meio) também foi monitorado. O crescimento celular foi mensurado no leitor

de microplacas de absorvância Sunrise™ (TECAN, Männedorf, Suíça) e análises pelo software Tecan Magellan™ segundo os seguintes parâmetros: comprimento de onda de medida 600nm, comprimento de onda de referência de 630nm, modo de leitura de absorvância normal, leituras eram feitas a cada 15 minutos por 150 ciclos, em uma faixa de temperatura de 30-32°C. Antes da leitura da densidade ótica D.O., a microplaca foi agitada por 5s e depois de um intervalo de 3s será feita a leitura. O crescimento celular foi registrado quantitativamente a cada leitura, resultando em uma tabela com valores numéricos de D:O: ao longo dos 150 ciclos.

3.7 Ensaios de competição - citometria de fluxo

Uma mistura na proporção 1:1 de células sensíveis (parental H4 diplóide marcado com GFP) e células tolerantes (mutantes e populações evoluídas, não marcadas) foram submetidas a dois ensaios de competição. O primeiro ensaio consistia no crescimento em meio contendo 0% e 8% (v/v) de etanol por 24h; o segundo ensaio de competição era feito através de choques de 20% (v/v) de etanol por 2h e recuperação por 48hs. Terminada a competição, foram quantificadas por citometria de fluxo células totais e contabilizado o número de células sensíveis expressando GFP. O número de células que não expressam GFP corresponde a quantidade de células da linhagem tolerante. Sabendo-se o número de células tolerantes (T) e o número de células sensíveis (S) nos pontos inicial (i) e final (f) da competição, pode-se obter uma quantificação de quanto a linhagem tolerante é mais “adaptada” do que a sensível. Esse é o chamado “*fitness*” e é calculado utilizando-se a fórmula:

$$\ln(T_i-T_f)-\ln(C_i-C_f)$$

T_i: % células tratadas iniciais

T_f: % células tratadas finais

C_i: % células controle iniciais (GFP)

C_f: % células controle finais (GFP)

3.7.1 Ensaios de competição em crescimento contínuo em meio contendo 0% e 8% de etanol.

Nas competições em meio sem etanol (0% v/v), para cada competição - entre os mutantes/evoluídos/progenitores contra a linhagem H4HO::GFP - culturas de cada

célula (sensível e tolerante) foram inoculadas separadamente em 20mL de meio YPD 2% de sacarose, sob agitação de 180RPM e 30°C; estas culturas foram monitoradas via espectrofotometria até que chegassem à fase estacionária do crescimento. Atingido este ponto, 10uL da cultura foi centrifugada, lavada com PBS 1x, diluída em 990uL de PBS1x e posteriormente filtrada (Filtro 50um Celltrics^R, Sysmex, Alemanha). Esta amostra passava então pela leitura no citômetro de fluxo indicando a concentração do número de células naquela diluição. Com os valores do número de células presentes na cultura de células sensíveis (HOH4::GFP) e tolerantes (evoluídos, mutantes e progenitores), calculou-se a proporção em volume necessária de cada uma das culturas para compor 1mL de mistura contendo a proporção de células 1:1. Esta mistura passava pelo mesmo processo de lavagem e diluição em PBS 1x citado anteriormente para verificar o número de células totais da mistura – valor que seria posteriormente utilizado para os cálculos do número de gerações e fitness. Uma vez atingida a proporção 1:1 entre células sensíveis e tolerante, 20uL da mistura foram inoculados em triplicatas de 20mL de meio YPD 2% de sacarose e colocados para crescer sob agitação de 180RPM, 30°C por 1 dia – atingindo o número de células totais na ordem de 10⁶. No dia seguinte, o resultado da competição em cada triplicata foi verificado por citometria de fluxo; para isso, 10uL da cultura mista passava pelo processo de lavagem, diluição e filtragem com PBS1x e depois pela contagem do número de células (sensível x tolerante).

Já nas competições que ocorreram em meio YPD 2% de sacarose contendo 8% de etanol, foi feita a realização de uma pré-adaptação das células através do crescimento em meios com concentrações de 2% e 4% de etanol (v/v) antes de serem misturadas na proporção 1:1 e inoculadas para competir em meio na concentração 8%. Inicialmente as células foram colocadas para crescer (120RPM, 30°C) em 20 mL de meio (YPD 2% sacarose) com concentração 2% de etanol e monitoradas até que atingissem a fase estacionária; chegando a este ponto, passava-se 200uL desta cultura para outro meio (20mL de YPD 2% sacarose) com concentração de etanol de 4%. Neste último meio, ao atingir a fase estacionária, 10uL das culturas passavam pelo processo de centrifugação, lavagem, diluição (1:10) e filtragem com PBS1x para que fosse realizado a contagem do número de células no citômetro de fluxo e preparada a mistura 1:1 entre células sensíveis e tolerantes que iriam competir. Desta mistura, 200uL eram passados, em triplicata, para meios YPD 2% sacarose com 8% (v/v) de etanol onde a competição ocorreria por 7 dias – tempo para atingir o número

total de células na ordem 10^5 . Após este período, 10uL de cada triplicata passava pelo processo de lavagem, diluição e filtragem com PBS1x para contagem do número de células (sensível x tolerante).

3.7.2 Competição em choques de etanol

Um outro ensaio de competição foi realizado entre as células tolerantes (populações evoluídas, mutantes e progenitores) e sensíveis (H4HO::GFP) que consistia em submeter a mistura de proporção celular 1:1 a um choque de etanol na concentração de 20% (v/v) em PBS1x por 2h.

Neste protocolo, as culturas de células tolerantes e sensível a serem testadas passaram por dois choques pré-adaptativos com 15% (v/v) de etanol no meio. Para os choques pré-adaptativos, as células cresceram separadamente em meio YPD 2% de sacarose até a fase estacionária; atingido este ponto, 1mL das células foram centrifugadas e o *pellet* formado foi ressuspendido em 1mL de PBS 1x contendo 15% (v/v) de etanol, onde permaneceram por 2h a 30°C. Após este período, as células foram transferidas separadamente para um novo meio YPD 2% sacarose sem álcool para recuperação e crescimento até a fase estacionária. Um segundo ciclo de choque de 15% (v/v) de etanol e recuperação em meio sem álcool foi repetido.

Após os choques de pré-adaptação, 10uL de cada cultura (tolerante e sensível) passaram pelo processo de lavagem, diluição (1:10) e filtragem com PBS1x e submetidas ao citômetro de fluxo para contagem de células. Com o número de células de cada cultura preparou-se 5mL de uma mistura de células tolerantes e sensíveis na proporção 1:1, da qual 1mL da mistura foi submetida – em triplicatas - a um choque de 20% (v/v) etanol por 2h. Passadas as 2h de choque onde ocorreu a competição, as células da mistura passaram pelo processo de recuperação e crescimento em meio YPD 2% de sacarose sem álcool por 72h e, posteriormente, foi feita a leitura de 10uL de cada triplicata no citômetro.

3.8 Cálculo do número de gerações e coeficiente de seleção/*fitness*

Foram calculados o coeficiente de seleção/*fitness* e o número de gerações necessárias para atingir o estado estacionário para os experimentos de cultivo em 0% e 8% de etanol. Para os experimentos de choques em 20% apenas foi calculado o coeficiente de seleção normalizados pelo progenitor respectivo.

Para os cálculos de coeficiente de seleção, foi utilizada a formula já descrita para o cálculo de fitness

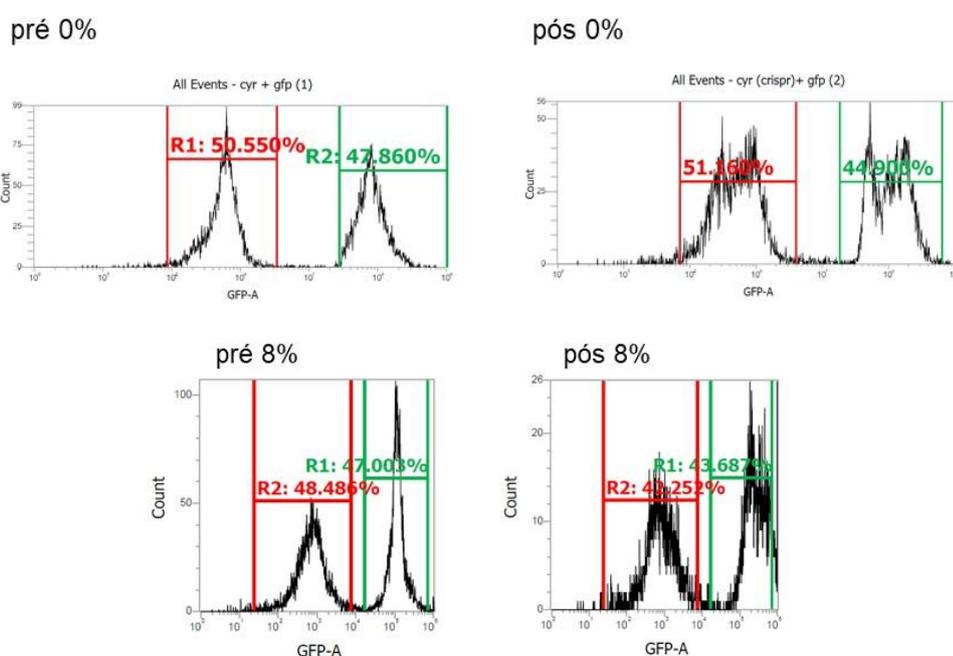
$$\ln(\text{Ti-Tf}) - \ln(\text{Ci-Cf})$$

Como as competições ocorreram com uma população H4::GFP, foi necessário normalizar os dados contra o coeficiente de seleção para o progenitor de cada experimento. Então, uma competição foi realizada com o progenitor específico e o H4::GFP, para determinar a diferença entre ambos, e o resultados normalizou as linhagens derivadas deste progenitor. Basicamente foram 3 progenitores, uma para as populações evoluídas, uma para os mutantes com inserção de cassete KANMx e outro para os mutantes produzidos a partir da técnica Crispr Cas9.

Após a normalização, nos experimentos de competição em 0 e 8% de etanol, foi possível calcularmos o número de gerações até o estado estacionário, onde calculamos o número de células iniciais e finais da competição, e aplicamos a fórmula abaixo, adaptada para as diluições realizadas.

$$\log_2 \text{Ci/Cf}$$

Com isto chegamos ao número de gerações ao longo do crescimento e dividimos o valor do coeficiente de seleção, normalizado por seu progenitor, pelo número de gerações, onde obtivemos quantidades de células com e sem GFP por geração. Dados podem ser vistos nos gráficos da seção de resultados.



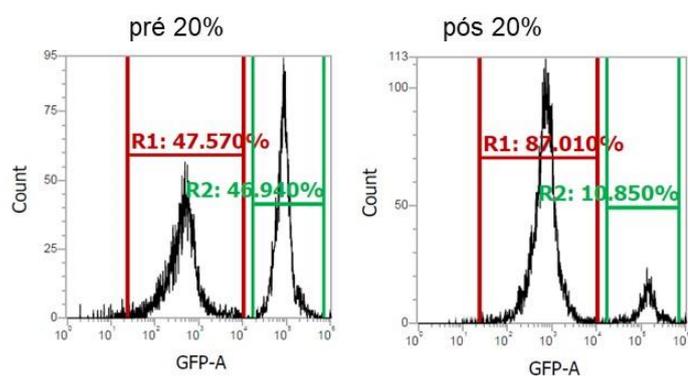


Figura 7. Gráficos representativos das competições realizadas com citometria de fluxo, demonstrando as % de células com (R2, em verde) e sem GFP (R1, em vermelho) antes e depois das competições com e sem etanol. Os gráficos mostram a competição da linhagem mutante H4::cyr1^{A474T} versus HOH4::GFP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Engenharia reversa das mutações via inserção de cassete KanMX e Crispr/Cas9.

Após as transformações no parental haploide H4 com o cassete KanMX de resistência ao antibiótico geneticina nos *locus* dos genes a serem deletados, e com os plasmídeos do sistema Crispr/Cas9 para as mutações pontuais, as colônias presentes nas placas de meio sólido com os respectivos antibióticos de seleção tiveram seu DNA extraído e este passou por reações de PCR confirmatórias da mutação. As reações de PCR foram feitas com *primers* exclusivos para cada mutação junto a um controle negativo; sendo que um dos pares de *primers* combinava um primer que flanqueia parte do *locus* gênico com outro primer que flanqueia parte do cassete de deleção (kanMX) ou a região da mutação introduzida pelo sistema Crispr/Cas9, enquanto o controle negativo consistia em um par de *primers* que amplifica o *locus* gênico na sua versão *wild type* sem a mutação. Desta forma, o resultado do PCR obtido para os mutantes construídos era sempre de uma reação positiva (para a mutação) e outra negativa (para o *wild type*). A tabela 6 relaciona os mutantes com o resultado funcional da mutagênese e pares de *primers* utilizados para a confirmação da transformação.

Função da proteína	Tipo de modificação	Resultado da mutagênese	Genotipagem PCR
Trealase ácida necessária para utilização de trealose extracelular.	$\Delta ath1$ (ATH1::kanMX)	Inativação insercional do gene	ATH1diaF/ProMX_rev 267pb ATH1diaF/ATH1diaR 218 pb
Envolvida na regulação do crescimento em resposta à disponibilidade de nutrientes extracelular (via de sinalização TOR).	$\Delta mds3$ (MDS3::kanMX)	Inativação insercional do gene	MDS3diaF/ProMX_rev 266pb MDS3diaF/MDS3diaR 231pb
Proteína de ligação ao DNA, regulação de transcrição pela RNA polimerase II.	$\Delta usv1$ (USV1::kanMX)	Inativação insercional do gene	USV1diaF/ProMX_rev 199 pb USV1diaF/USV1diaR 208 pb
Trealase neutra, degradação de trealose.	$\Delta nth1$ (NTH1::kanMX)	Inativação insercional do gene	NTH1diaF/ProMX_rev 206 pb NTH1diaF/NTH1diaR 199pb
Ativa proteína Cdc42p envolvida na regulação do ciclo celular e padrão de brotamento (axial ou bipolar)	$\Delta bud3$ (BUD3::kanMX)	Inativação insercional do gene	BUD3ExtL/ProMX_rev 232 pb BUD3ExtL/BUD3ExtR 332 pb

<p>Proteína de ligação à GTP, regula resposta à disponibilidade de nutrientes extracelular, esporulação e crescimento.</p>	<p>$\Delta ras2$ (RAS2::kanMX)</p>	<p>Inativação insercional do gene</p>	<p>RAS2diaF/ProMX_rev 199 pb RAS2diaF/RAS2diaR 275 pb</p>
<p>Ativa proteínas Rho1p e Rho2p envolvidas na regulação da polaridade celular</p>	<p>$\Delta rom2$ (ROM2::kanMX)</p>	<p>Inativação insercional do gene</p>	<p>ROM2P1for/ProMX_rev 222 pb ROM2P1for/ROM2P1rev 295 pb</p>
<p>Ativa proteínas Rho1p e Rho2p envolvidas na regulação da polaridade celular</p>	<p>$rom2^{Gli440Arg}$ (crispr)</p>	<p>Substituição pontual do aminoácido</p>	<p>ROM2P3for/ROM2P3rev Produto: 378 pb Produto com restrição pela enzima Sall: 195/183 pb <i>Wild type</i>: 378pb</p>
<p>Transportador transmembrana de peptídeos.</p>	<p>$\Delta ptr2$ (PTR2::kanMX)</p>	<p>Inativação insercional do gene</p>	<p>PTR2for/ProMX_rev 208 pb PTRfor/PTRP4rev2 233 pb</p>
	<p>$ptr2^{Trp362Gli}$ (crispr)</p>	<p>Substituição pontual do aminoácido</p>	<p>Sequenciamento</p>
<p>Endonuclease necessária para conversão de gene no <i>locus</i> MAT.</p>	<p>Δho (HO::kanMX)</p>	<p>Inserção de marcador na linhagem referência H4 para as competições</p>	<p>HOdiaF/ProMX_rev 208 pb HOdiaF/HOdiaR 262 pb</p>

Adenilato ciclase, necessária para produção do sinalizador cAMP (via cAMP/PKA) envolvido em diversos processos celulares	<i>cyr1^{Ala474Tre}</i> (crispr)	Substituição pontual do aminoácido	2NestCYR1f/2NestCYR1r 173 pb
	<i>cyr1^{Ala474Tre}</i> + Δ ath1	Mutação pontual na proteína Cyr1 e inativação <i>ATH1</i>	Sequenciamento
	<i>cyr1^{Ala474Tre}</i> + <i>Rom2^{Gli440Arg}</i>	Combinação das mutações pontuais das proteínas Cyr1 e Rom2	Sequenciamento

Tabela 6. Mutantes construídos por meio de engenharia reversa das mutações no background do parental haploide H4 PE-2. A primeira coluna descreve a função da proteína resultante da tradução do gene selvagem, a segunda e terceira coluna relacionam o tipo de modificação molecular e resultado funcional da mutagênese; a última coluna indica os primers utilizados na confirmação da mutagênese após a transformação, alternativamente, é indicado o sequenciamento para as mutações pontuais.

Abaixo (figura 8), um exemplo do resultado da eletroforese do produto de PCR para os mutantes Δ rom2 e Δ prr2 em gel de agarose 2%.

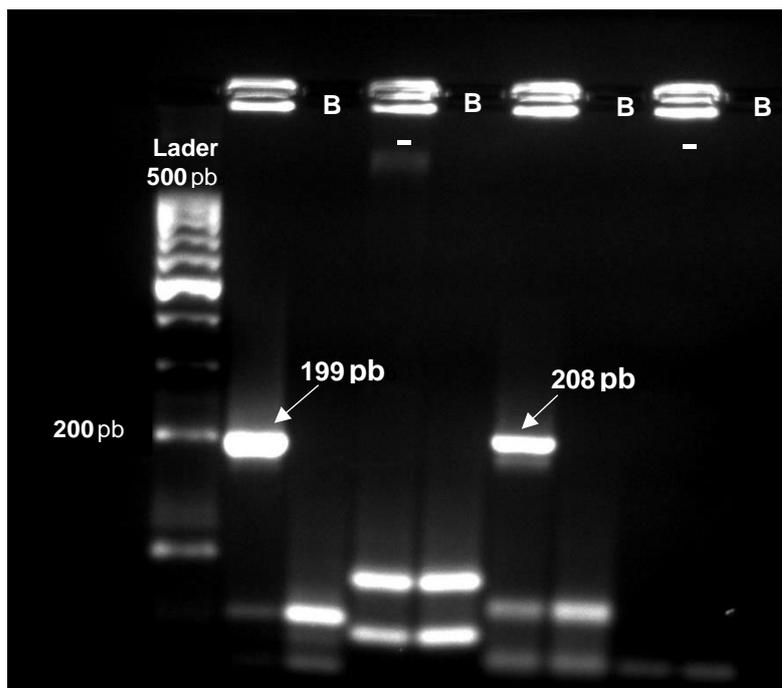


Figura 8. PCRs de genotipagem dos mutantes $\Delta rom2$ e $\Delta ptr2$ construídos por engenharia reversa. Produtos de PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. A banda de 199 pb é o produto da reação de PCR com o par de *primers* ROM2P3for/ProMX_rev, a banda de 208 pb é o produto da reação de PCR com os *primers* PTR2for/ProMX_rev; ambos produtos de PCR confirmam a inserção do cassete de deleção KanMX nos locus dos genes ROM2 e PTR2 do parental haplóide H4. As reações de controle negativo (-) foram feitas com os *primers* ROM2P3for/ ROM2P3rev (295pb) para o mutante $\Delta rom2$ e os *primers* PTR2for/PTR2P4rev2 para o mutante $\Delta ptr2$. Para cada reação é feito uma reação em branco (B).

4.2. Diploidização dos parentais, mutantes e populações evoluídas.

Após a transformação com o plasmídeo contendo a endonuclease HO, indução à troca de *mating type* em meio com galactose e curagem para eliminação do plasmídeo, PCRS confirmatórios da diploidia foram feitos com os *primers* MATpaper, MAT alfa e MATA, sendo que os diploides deveriam apresentar bandas para ambas reações, indicando a presença do *locus* A e *locus* alfa funcionais, ou seja, a diploidia. Abaixo (figura 8), um exemplo do resultado da eletroforese em gel de agarose 2% do produto de PCR para os mutantes $\Delta rom2$, $\Delta ptr2$ e o haploide H4.

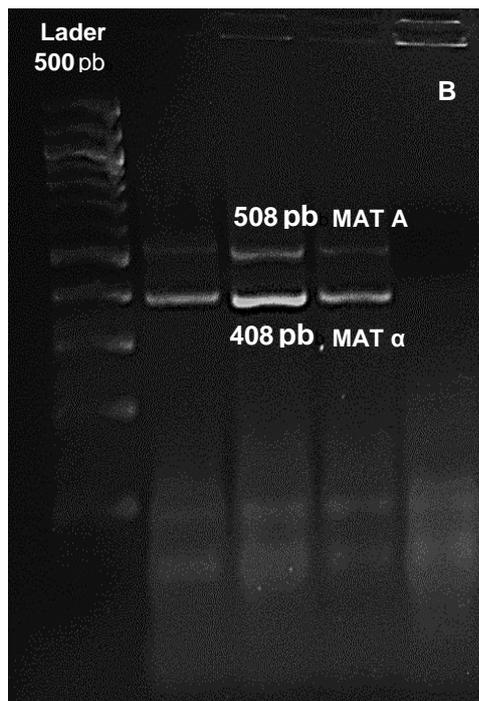


Figura 8. Produtos de PCR confirmatórios da diploidização para os mutantes $\Delta rom2$, $\Delta ptr2$ e o parental H4. O produto de PCR de 508 pb corresponde ao MAT A e o produto de 408 pb corresponde ao MAT α . As reações multiplex foram feitas com os *primers* MAT A, MAT paper e MAT α . Uma reação em branco é indicada na figura pela letra B.

4.3. Inserção de GFP no parental diploide H4.

O parental diploide H4, após o processo de diploidização foi submetido à transformação pelo sistema Crispr/Cas9 para a inserção do gene GFP funcional no *locus* HO. Os PCRs de confirmação da transformação são mostrados na figura 9.

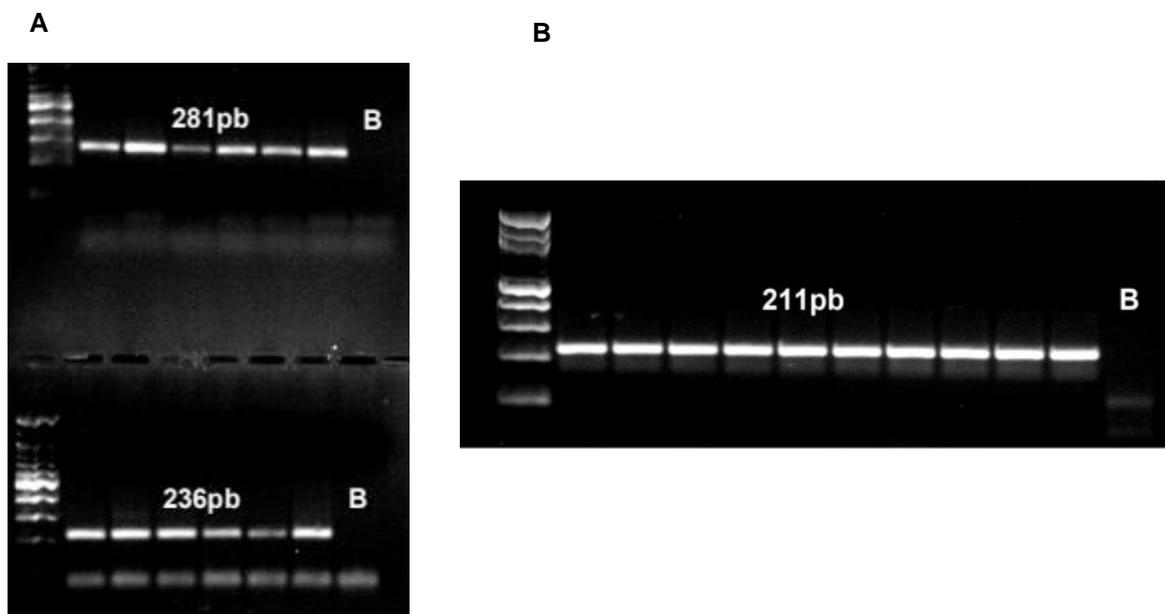


Figura 9. PCRs de colônias, confirmatórios da inserção do gRNA e da inserção de GFP no locus do gene HO da *S.cerevisiae* H4 PE-2. **(A)** Produto de PCR de 281pb com os *primers* B_jac/ Or2_r confirma clonagem do gRNA1. **(B)**. PCRs de colônias de transformadas; produto de PCR de 211pb com os *primers* HoE_f/ ProMX_r confirmando inserção do constructo GFP no *locus* HO.

Estudos que utilizam a abordagem da evolução adaptativa têm sido de grande importância para compreender o fenômeno da tolerância, pois estes modelos permitem selecionar para um determinado fenótipo para que posteriormente sejam feitas análises de quais modificações genéticas permitiram sua adaptação. Diversos desenhos experimentais podem ser testados com este fim, e é o que tem sido feitos nos estudos que objetivam descobrir quais as vias moleculares de adaptação de células de levedura à altas concentrações de etanol e outros estressores. Nestes estudos dois modelos podem ser utilizados para realizar a evolução experimental: através da exposição das células à um estresse crônico ou à estresse agudo. No caso do estresse crônico, as células de levedura são colocadas em um meio em que as concentrações de etanol são gradualmente elevadas, sem que haja ciclos de recuperação celular após o estresse; nos experimentos que estudam às respostas ao estresse crônico, as células de levedura são submetidas a um curto período de exposição em meio com altas concentrações de etanol – geralmente acima do limiar da concentração letal – e posteriormente submetidas a um ciclo de recuperação que consiste no crescimento em meio sem etanol.

Quanto à exposição à estresse crônico, isto é, cultivo contínuo em meio com concentrações crescentes de estressor, Wright *et al.*(2011) usaram esta abordagem para evoluir uma cepa de *S.cerevisiae* com maior tolerância ao ácido acético – produto liberado durante a hidrólise de componentes lignocelulósicos na indústria do bioetanol de segunda geração. Neste experimento, a levedura era submetida ao crescimento em um meio contínuo em que as concentrações do agente estressor eram progressivamente aumentadas; no entanto ao fim do experimento, após mais de 400 gerações, ao inocular a cepa evoluída em um meio sem ácido acético, ela não apresentava mais a tolerância necessária para crescer em meio com altas concentrações de ácido acético. Neste sentido, a tolerância apresentada pela cepa “evoluída” na realidade era apenas uma tolerância induzida/adquirida, isto é, um

fenótipo temporário de resistência dependente dos fatores externos, que quando cessados, retornava à condição de suscetibilidade ao estresse.

Inspirado nestes achados, Gonzalez-Ramos *et al.* (2016) desenvolveu um desenho de evolução experimental baseado na exposição ao estresse agudo como alternativa para se atingir uma tolerância constitutiva ao invés de induzida. Para isso, as células de levedura passavam por um cultivo de pré-adaptação em que a concentração do agente estressor era subletal, posteriormente este cultivo era transferido para um meio em que a concentração do ácido acético era maior e letal para maior parte das células; após o crescimento neste meio, as células eram transferidas para um meio sem ácido acético. Assim, foram repetidos ciclos de cultivo que alternavam entre meio com e sem o inibidor; ao final do experimento, mesmo após três transferências para meio sem ácido acético, as cepas evoluídas foram capazes de crescer em meio contendo altas concentrações do estressor, ou seja, atingindo-se uma tolerância constitutiva.

A pré-adaptação das células em um meio com concentrações subletais se mostra de grande importância para os experimentos de evolução adaptativa pois ela garante uma diminuição da duração da fase de latência quando esta cultura é transferida para um meio com altas concentrações de inibidor; isto ocorre porque durante a pré-adaptação a fração de células capazes de crescer no meio contendo o estressor aumenta, possibilitando iniciar o crescimento mais rapidamente quando submetidas a condições mais extremas de estresse. (GONZALEZ-RAMOS *et al.*, 2016). Como dito anteriormente, quando submetidas a doses subletais, as células passam por uma reprogramação de vias metabólicas importantes, o que lhes garante a proteção necessária para iniciar o crescimento em meios mais hostis.

Em nosso estudo, utilizamos a estratégia de evoluir a cepa PE-2 de *S.cerevisiae* submetendo-as a uma pré-adaptação em meio com concentrações subletais de etanol e posteriormente expondo-as a choques de etanol, isto é, um estresse agudo de crescimento em meio com altas concentrações de etanol (>19% v/v) por curto período de tempo (2h), após o qual as células passavam por ciclos de recuperação em meio sem etanol. Assim, a pré-adaptação em doses não inibitórias do etanol permitiu a diminuição da fase de latência no crescimento posterior, em meio contendo concentração letal de etanol e a alternância entre meio com e sem inibidor objetivava atingir uma tolerância constitutiva da levedura ao etanol.

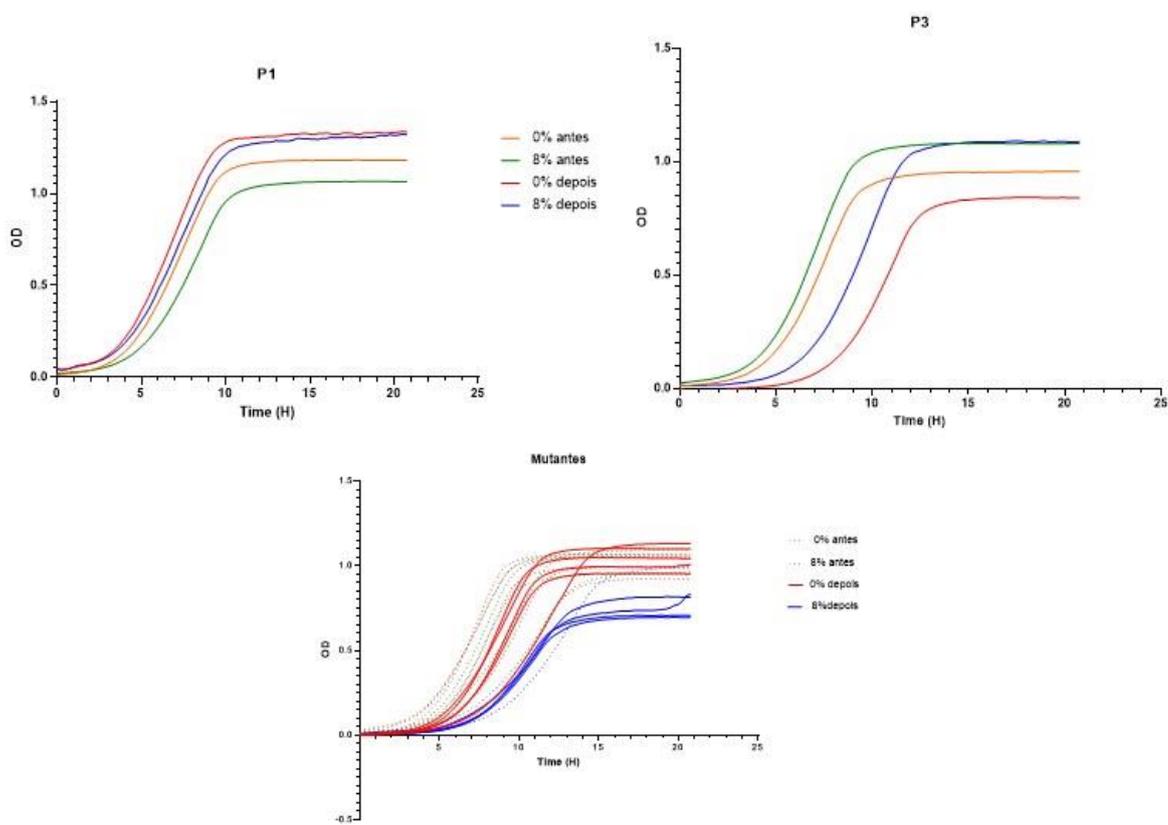


Figura 10. Gráficos de curvas de crescimento da população P1, P3 e de mutantes com inserção do cassete KanMX, para avaliação da pré adaptação antes do crescimento com e sem etanol (0 e 8%).

Ao fazer as curvas de crescimento na presença de etanol, observamos uma variação nos resultados o que tornou difícil a interpretação do fitness por esta técnica. Então optamos por analisar as variações fenotípicas pelos ensaios de competição na citometria de fluxo, pois poderíamos observar diferenças mais sutis no fenótipo de tolerância ao etanol.

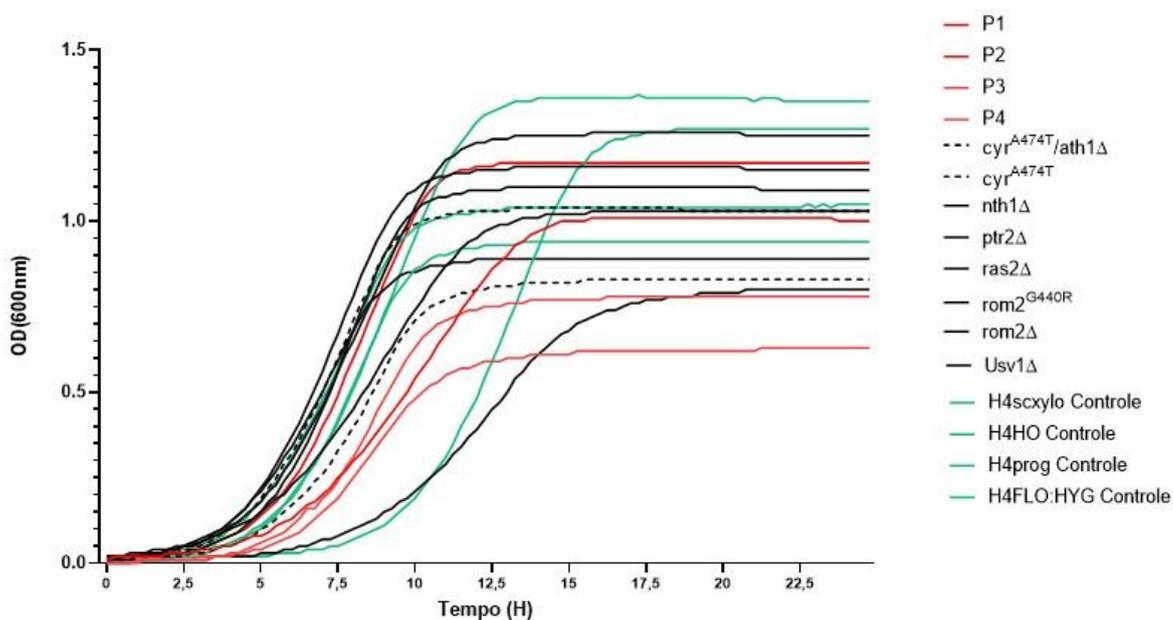


Figura 11. Gráfico das curvas de crescimento de progenitores, populações evoluídas e mutantes em 8% de etanol.

Sabendo das possíveis diferenças entre as respostas a estresse crônico e agudo, desenvolvemos ensaios de competição em que as populações evoluídas, mutantes e respectivos progenitores foram submetidos à crescimento contínuo em doses subletais de etanol (estresse crônico) ou a ciclos de choques com 20% (v/v) de etanol no meio, seguido de recuperação celular em meio sem etanol. Realizando-se os cálculos do número de gerações e normalizando em relação ao progenitor de cada grupo experimental, foi possível montar os gráficos que se seguem.

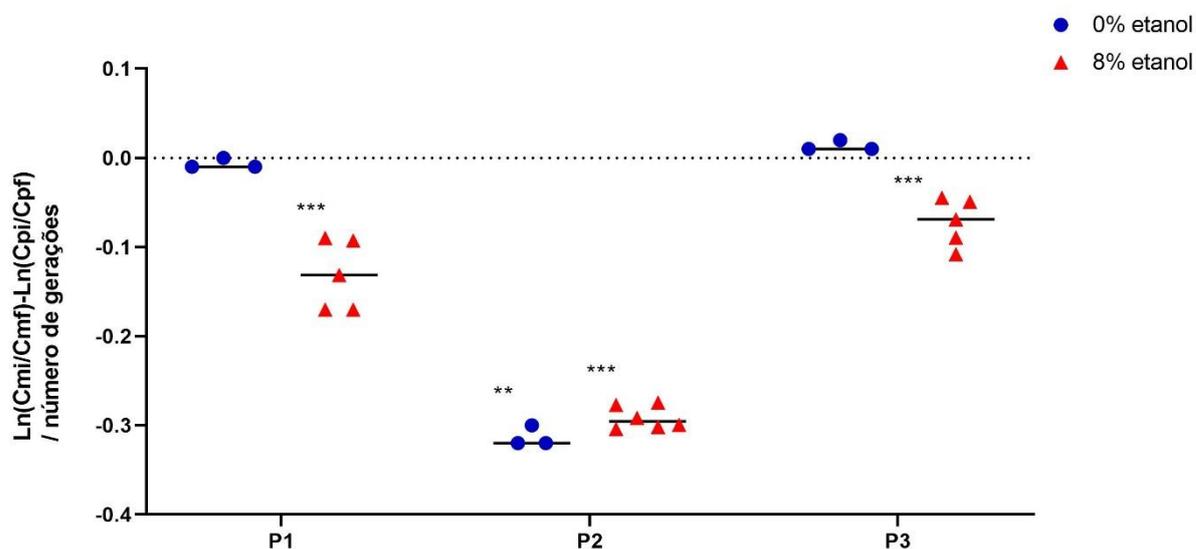


Figura 12. Fitness das populações evoluídas (P1, P2 e P3) em relação ao progenitor H4 diplóide nos ensaios de competição em meio contínuo com dose subletal de etanol. Pontos azuis indicam o resultado das triplicatas nas competições em meio sem etanol (0% etanol), triângulos vermelhos indicam o resultado das triplicatas em meio contendo dose subletal de etanol (8% etanol). A média do fitness/número de gerações das triplicatas do progenitor H4 é indicado pela linha tracejada. Teste estatístico ANOVA de uma via $***p < 0,0001$ e $**p < 0,001$, com pós teste e comparação múltipla de Tukey.

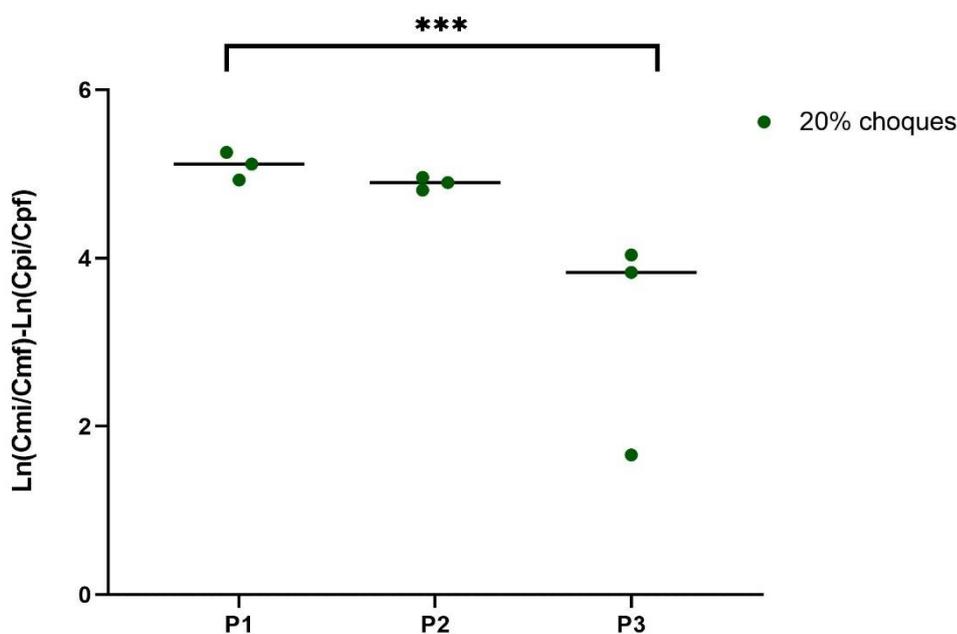


Figura 13. Fitness das populações evoluídas (P1, P2 e P3) em relação ao progenitor H4 diplóide nos ensaios de competição em ciclos de choque de etanol em dose letal (20% (v/v)). Pontos verdes indicam o resultado das triplicatas de cada população. Teste estatístico ANOVA de uma via $***p < 0,0001$, com pós teste e comparação múltipla de Tukey.

As populações evoluídas, como esperado, mostraram um alto *fitness* em relação ao ancestral nos ensaios de competição em choques de 20% (v/v) de etanol. Estas populações são resultantes deste tipo de experimento de evolução, sob estresse agudo e, portanto, disponibilizam em seu genoma diversas mutações que possibilitaram sua melhor adaptação para este tipo de estresse em detrimento de um crescimento normal em meio com inibidor em doses subletais ou ausente. É interessante que a população P2 apresenta o menor número de mutações ao final do experimento de evolução (tabela 1) mas demonstra um alto *fitness* nos ensaios de competição sob estresse agudo e um baixo *fitness* nos ensaios de competição sob estresse crônico. Este resultado é um indicativo de que as mutações encontradas

nesta população, nos genes *ATH1* e *CYR1* provavelmente são os responsáveis por conferir uma maior tolerância ao etanol quando este se encontra em doses letais no meio; as mesmas mutações (acrescidas de outras) são encontradas na população P1, que apresenta o maior fitness neste ensaio de competição.

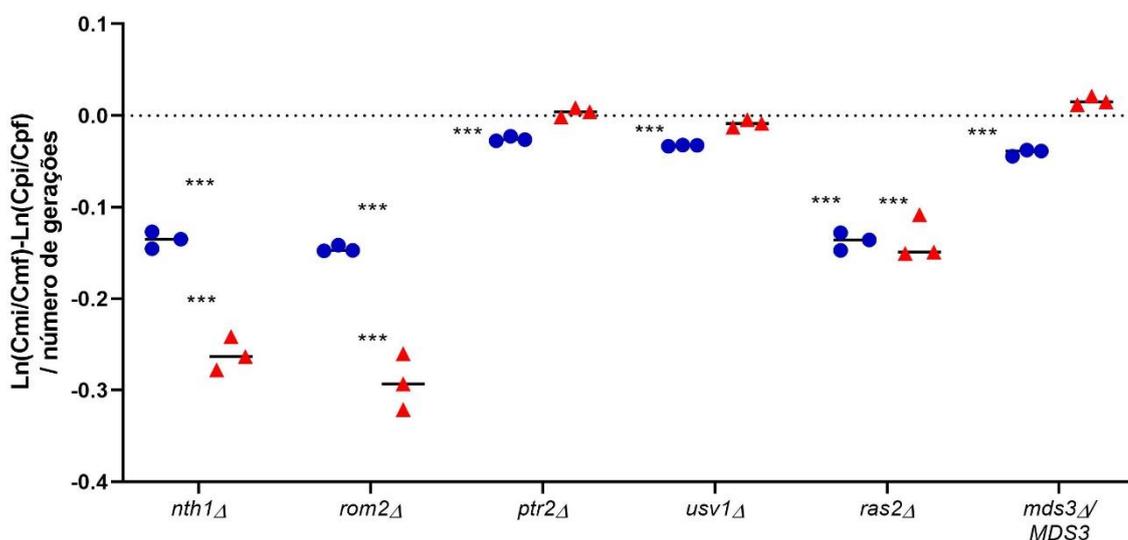


Figura 14. Fitness dos mutantes com deleção de genes em relação ao progenitor H4 diplóide nos ensaios de competição em meio contínuo com dose subletal de etanol. Pontos azuis indicam o resultado das triplicatas nas competições em meio sem etanol (0% etanol), triângulos vermelhos indicam o resultado das triplicatas em meio contendo dose subletal de etanol (8% etanol). A média do fitness/número de gerações das triplicatas do progenitor H4 é indicado pela linha tracejada. Teste estatístico ANOVA de uma via *** $p < 0,0001$, com pos teste e comparação múltipla de Tukey.

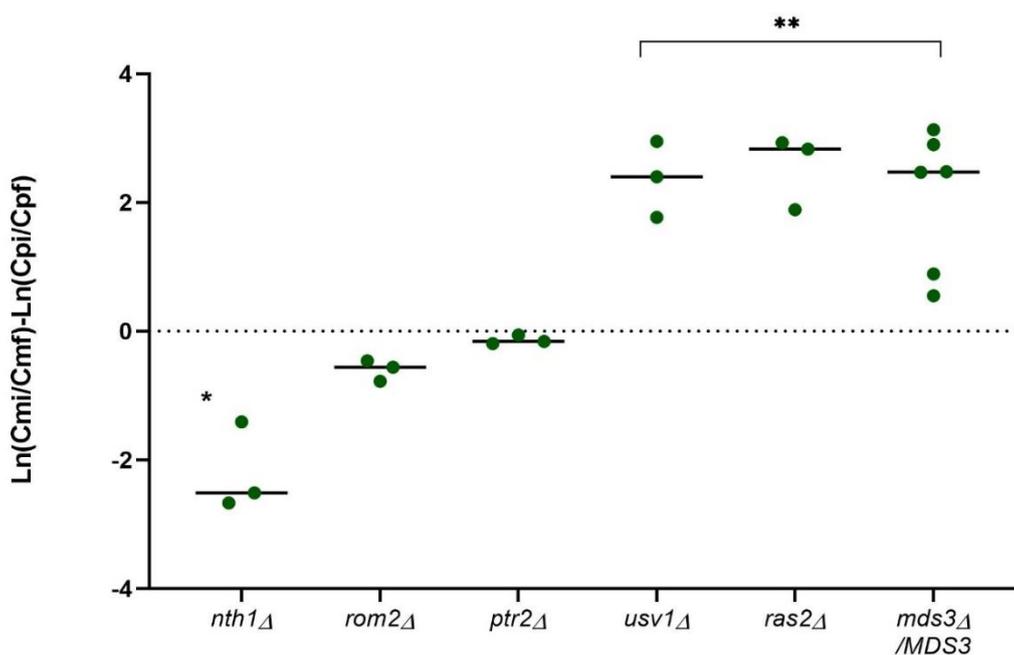


Figura 15. Fitness dos mutantes com deleção de genes em relação ao progenitor H4 diplóide nos ensaios de competição em ciclos de choque de etanol em dose letal (20% (v/v)). Pontos verdes indicam o resultado das triplicatas de cada população. Teste estatístico ANOVA de uma via ** $p < 0,001$, * $p < 0,007$ com pós teste e comparação múltipla de Tukey.

No caso dos mutantes que reconstituem a deleção dos genes encontrados nas populações evoluídas, merece atenção o gene *RAS2* que está envolvido na rota Ras/cAMP/PKA. Em condições normais, onde há oferta de fontes de carbono fermentáveis, o gene *RAS2* codifica uma GTPase que se encontra na forma ativa (GTP) estimulando a enzima adenilato ciclase (codificada pelo gene *CYR1*), causando aumento dos níveis de cAMP - associado à rápido crescimento celular e suscetibilidade à estresse agudo (LI *et al.*, 2018). Alternativamente, quando os níveis de AMP cíclico caem devido à distúrbio. Quando não há fontes de carbono fermentáveis no meio ou na presença de inibidores como o etanol, os níveis de AMP cíclico caem devido à repressão dos genes *IRA1/IRA2* sobre *RAS2* – que passa para a forma GDP. Com os níveis de cAMP baixos, os fatores de transcrição Msn2p e Msn4p que, no núcleo, reprimem a transcrição de diversos genes ligados ao crescimento celular e ativam os genes ligados a respostas à estresse. Assim, quando a via Ras/cAMP/PKA está reprimida, como no caso da mutação $\Delta ras2$, há uma diminuição no crescimento celular e aumento da tolerância ao estresse agudo (LI *et al.*, 2018).

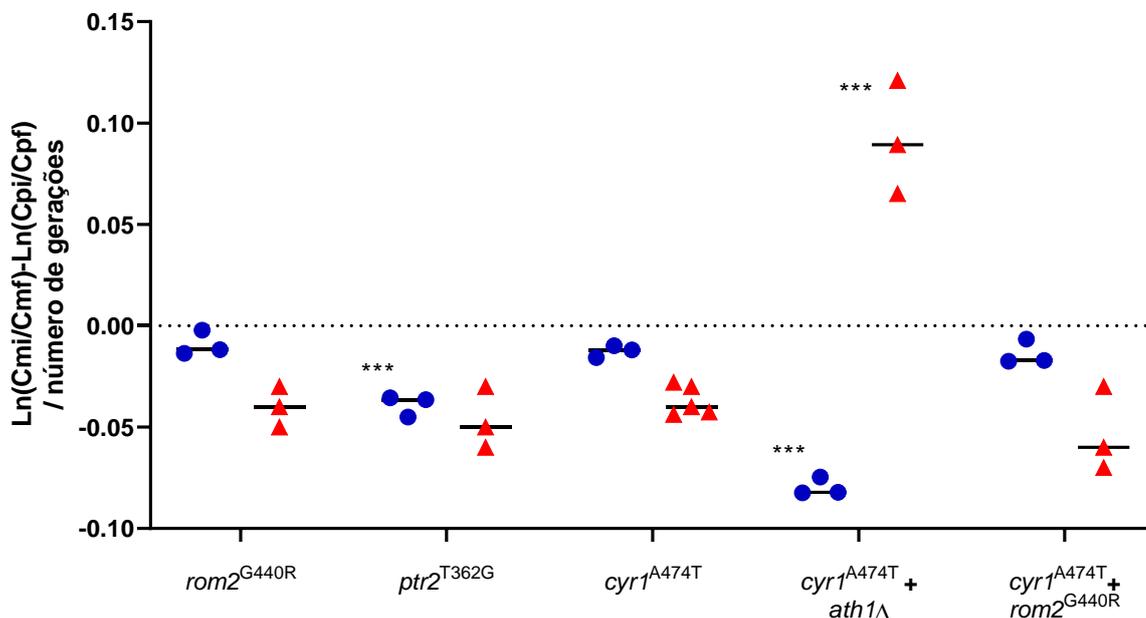


Figura 16. Fitness dos mutantes com substituição pontual de aminoácido em relação ao progenitor H4 diplóide nos ensaios de competição em meio contínuo com dose subletal de etanol. Pontos azuis indicam o resultado das triplicatas nas competições em meio sem etanol (0% etanol), triângulos vermelhos indicam o resultado das triplicatas em meio contendo dose subletal de etanol (8% etanol). A média do fitness/número de gerações das triplicatas do progenitor H4 é indicado pela linha tracejada. Teste estatístico ANOVA de uma via $***p < 0,0001$, com pós teste e comparação múltipla de Tukey.

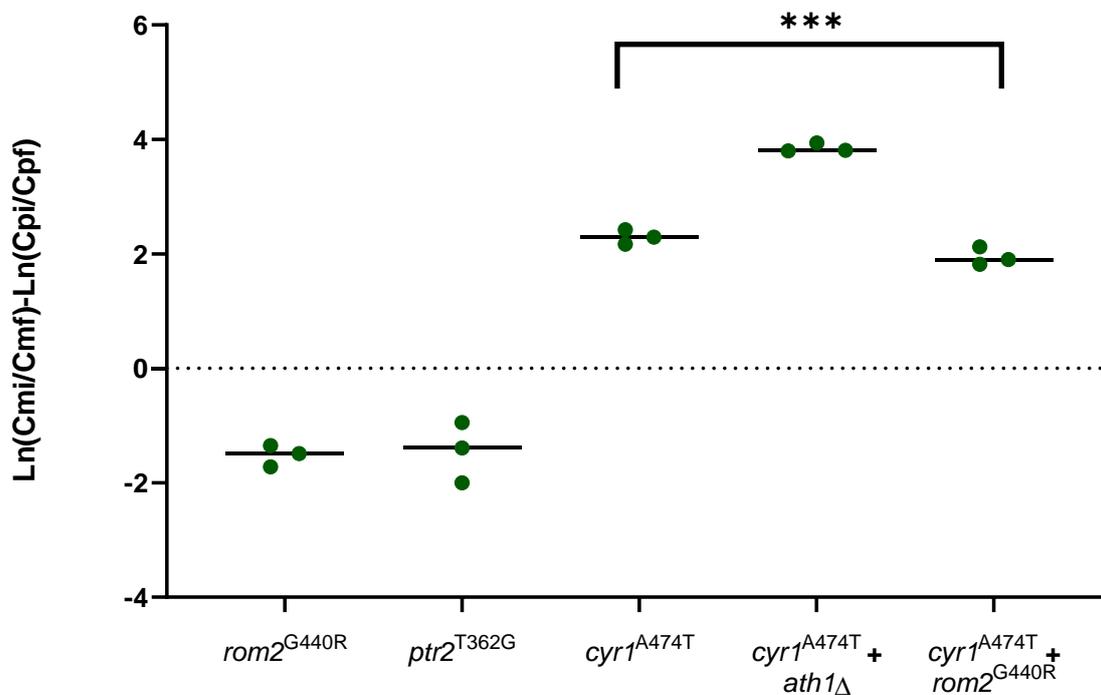


Figura 17. Fitness dos mutantes com mutação pontual de aminoácido em relação ao progenitor H4 diplóide nos ensaios de competição em ciclos de choque de etanol em dose letal (20% (v/v)). Pontos verdes indicam o resultado

das triplicatas de cada população. Teste estatístico ANOVA de uma via *** $p < 0,0001$, com pós teste e comparação múltipla de Tukey.

Em relação às mutações pontuais reconstituídas no background do parental diploide H4 PE-2, a mutação *cyr^{A474T}* parece ser responsável por grande parte da adaptação à estresse agudo. Em *Sacharomyces cerevisiae*, este gene codifica a enzima adenilato ciclase que converte ATP em cAMP, um sinalizador secundário intracelular que ativa a proteína quinase A (PKA), caracterizando a via cAMP-PKA que possui papel fundamental na regulação das atividades celulares em resposta a mudanças nutricionais no meio. A PKA fosforila diversas outras proteínas envolvidas no processo de transcrição, ciclo celular, acúmulo de carboidratos como glicogênio e trealose.

A via cAMP-PKA tem sua atividade regulada pela concentração de açúcares fermentáveis ou pela fase do crescimento celular; ela é ativa quando os níveis de açúcares fermentáveis são altos no meio e diminui quando esta concentração abaixa ou quando a célula entra na fase estacionária do crescimento. A ativação da via cAMP-PKA antagoniza a ação dos fatores de transcrição Msn2 e Msn3 envolvidos no processo de ativação dos fatores de resposta ao estresse. Neste sentido, quando a via cAMP-PKA está com sua atividade reduzida, é notável a diminuição na taxa de crescimento e aumento da tolerância a múltiplos estresses.

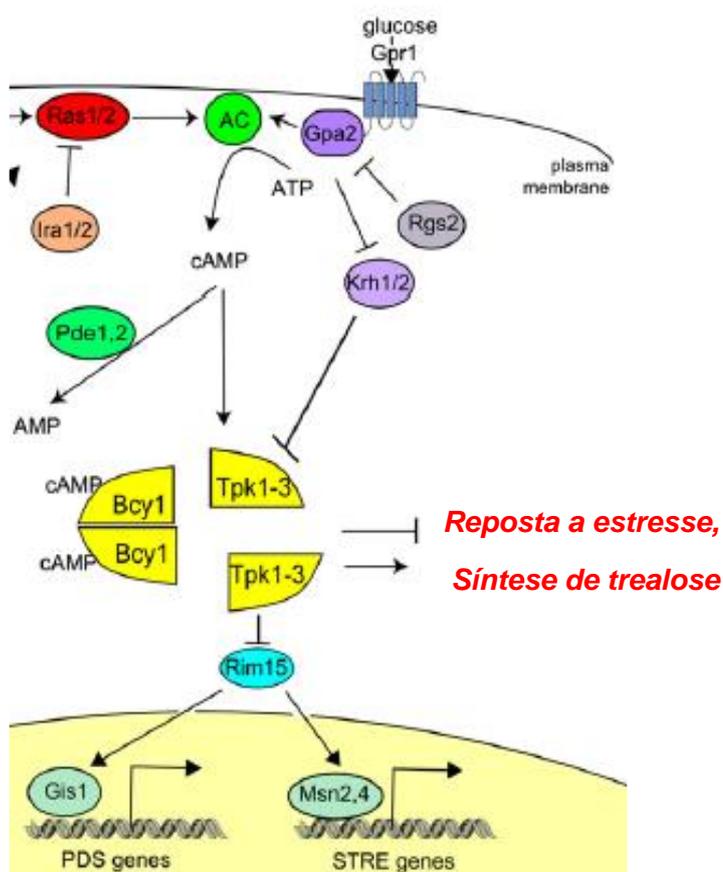


Figura 18 Via Ras/cAMP/PKA. Adaptada de Conrad M *et al.*, 2014

Um estudo de Lida (1988) demonstrou que a inserção de retrotransposons Ty na região 5' do gene *Cyr* resultou em uma diminuição em 3x da atividade da adenilato ciclase e consequentemente um aumento de resistência à altas temperaturas, radiação UV e etanol; em contraponto, durante a fase exponencial de crescimento, estes mutantes apresentaram um baixo crescimento em relação ao progenitor. Ainda neste contexto, Ma *et al.* (1997) demonstraram que a redução da adenilato ciclase/PKA levam a uma redução da taxa de crescimento e um aumento do tempo em que a célula permanece na fase *lag* que precede o crescimento exponencial.

Hong *et al.* (2018), no entanto, realizaram um estudo em que foram feitas deleções de diferentes tamanhos (30bp a 150 bp) na região promotora do gene *Cyr1* a fim de promover uma redução na atividade da via cAMP/PKA sem perda da atividade fermentativa/redução na taxa de crescimento. Dois mutantes, com 90bp e 120bp de deleção da região promotora apresentaram 2 e 3x diminuição na atividade da adenilato ciclase, respectivamente, e aumentaram sua tolerância ao etanol e à temperatura em comparação com o progenitor. Essas cepas mutantes também

exibiram mesma taxa de crescimento e fermentação que o progenitor e aumentaram a produtividade de etanol em 14% e 15%, respectivamente. Estes resultados mostram que o aumento de tolerância à estresses e de fermentação/crescimento podem ser compatíveis quando a expressão de *CYR1* é regulada.

Neste contexto, é possível que a mutação que troca um dos aminoácidos no gene *CYR* em nosso estudo, pode estar relacionada com a diminuição da atividade enzimática da adenilato ciclase, gerando uma maior tolerância tanto no estresse agudo quanto no crônico. Quando somado à deleção do gene *ATH1*, o mutante *cyr^{A474T} + Δath1* apresentou a melhor resposta à estresse agudo e foi o único, dentre mutantes e populações evoluídas, que demonstrou melhor fitness nas competições em crescimento contínuo em doses subletais, conferindo um fenótipo único em nosso estudo de uma tolerância constitutiva tanto para doses letais como para doses subletais do inibidor.

Em relação ao gene *ATH1*, ele codifica a enzima trealase ácida que degrada a trealose extracelular, convertendo-a em duas moléculas de glicose. A trealose é um carboidrato de reserva que tem grande importância na resistência à estresse pois ela se acumula na região periférica do plasma celular da levedura, impedindo a entrada de inibidores na célula; passado o estresse, a trealose é degradada para ser utilizada como fonte de carbono, recuperando o crescimento celular. Kim J. *et al.* (1996) construíram uma cepa de *S.cerevisiae* em que o gene *ATH1* foi deletado - abolindo a ação da trealase ácida - e este mutante exibiu altos níveis de trealose acumulada e uma maior tolerância a diversos estresses, incluindo níveis tóxicos de etanol.

A respeito do acúmulo de trealose como mecanismo de proteção celular contra estresse, BANDARA A. *et al* (2009) investigaram de que forma a trealose acumulada (pela deleção do gene que codifica a trealase neutra, *NTH1*) conferia proteção contra estresse agudo ou crônico através de ensaio de competição entre os mutantes *Δnth1* e o progenitor selvagem. Neste estudo foi constatado que a trealose tem um papel fundamental na tolerância ao etanol quando o inibidor se encontra em concentrações letais no meio, mas não em doses subletais uma vez que na competição em doses subletais (7% (v/v) de etanol) o mutante e o progenitor apresentaram o mesmo fitness e em doses letais (de 10% a 18% (v/v)) o mutante *Δnth1* - que tinha acúmulo de trealose - apresentou um fitness maior. Os autores concluem que os efeitos da

trealose na proteção contra o etanol é de natureza dependente da concentração do inibidor no meio em que a trealose protege as proteínas citosólicas contra os danos do etanol e que a proteção do carboidrato de reserva em relação à estabilidade da membrana é de menor importância na influência do fitness e crescimento em doses subletais. Este diagnóstico parece estar de acordo com nossos resultados, mas a confirmação necessita de maior investigação em relação ao nível de trealose acumulada no mutante *cyr^{A474T} + Δath1* e/ou no mutante *Δath1* (que não foi construído para este estudo), uma vez que o mutante *Δnth1* não apresentou vantagem competitiva em relação ao ancestral em nenhum dos ensaios realizados.

5. CONCLUSÃO

Experimentos de evolução adaptativa têm sido a abordagem mais utilizada em estudos que buscam compreender quais os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos na adaptação dos microorganismos a diferentes meios e recursos. Esta abordagem permite a criopreservação de amostras ao longo das gerações, possibilitando uma posterior comparação entre ancestrais e evoluídos que podem indicar em que momento durante a evolução uma mudança particular foi primordial para o desenvolvimento do fenótipo selecionado.

No caso dos estudos a respeito da tolerância a estresses, dois modelos podem ser utilizados: exposição à estresse agudo ou crônico, que geram mecanismos adaptativos e respostas fisiológicas diferentes nas células. Em nosso estudo utilizamos a estratégia de expor as células à estresse agudo submetendo-as a ciclos de choque com concentrações letais (>20% (v/v) de etanol, porém com ciclos de recuperação sem o inibidor - permitindo a seleção de uma tolerância constitutiva - além de uma pré-adaptação (anterior ao choque) das células em concentrações subletais com o objetivo de diminuir a fase de latência durante o crescimento em dose letal.

A via Ras/cAMP/PKA é de fundamental importância na coordenação de diversos processos fisiológicos e metabólicos na célula e é sua atividade que regula as respostas à diversos estresses. Quando sua atividade é diminuída ou inibida, fatores

de transcrição (Msn2 e Msn4) são transferidos para o núcleo onde agem regulando a expressão de diversos genes em resposta às perturbações causadas pelo estresse. Uma das respostas fisiológicas mais comumente relatadas é o acúmulo de trealose, um carboidrato de estoque que funciona como protetor de proteínas citosólicas e dos componentes da membrana celular.

Neste trabalho, a mutação *cyr^{A474T}* + Δ *ath1* foi a que conferiu maior fitness em relação ao ancestral tanto em meio com concentrações letais, quanto em concentrações subletais, um fenótipo único em nossos experimentos. A hipótese levantada a respeito do efeito destas mutações, de acordo com a literatura, é de que a adenilato ciclase (Cyr1p) tem sua atividade reduzida, gerando uma inibição da produção de cAMP e conseqüentemente da via cAMP/PKA, o que estimula uma maior tolerância à estresse. A mutação *cyr^{A474T}* merece destaque pois nos ensaios de competição em choques de etanol, os três mutantes que a carregavam em seu genótipo obtiveram um fitness em relação ao progenitor tão alto quanto das populações evoluídas no mesmo ensaio (figuras 17 e 13, respectivamente). A deleção do gene *ATH1*, por sua vez, pode estar ligado à um acúmulo de trealose que confere maior proteção e resistência em ambos tipos de estresse, sendo que sua importância é fundamental na proteção de proteínas citosólicas contra as perturbações causadas por concentrações letais de etanol.

Esta dupla mutação (*cyr^{A474T}* + Δ *ath1*) aparece ainda nas duas populações evoluídas (P1 e P2) que melhor se saíram nas competições em choques de etanol, o que corrobora a hipótese de sua importância no aumento de tolerância ao etanol. No entanto, seria interessante para o melhor entendimento da contribuição da deleção do gene *ATH1* a sua reconstituição isolada no background do parental para que os ensaios de competição e outros adicionais, como a taxa de acúmulo de trealose após doses letais ou subletais de etanol fossem feitos.

Estudos indicam que é de grande dificuldade otimizar o crescimento e as respostas de tolerância à estresse independentemente, uma vez que um processo afeta ao outro de forma inversa. Neste sentido, a diminuição da taxa de crescimento para compensar a taxa de sobrevivência devido a reprogramação da expressão gênica em condições de estresse é uma solução trivial geralmente documentada nestes estudos (YANG e

TAVAZOIE, 2020). Deste modo, as mutações que possivelmente contribuem para uma maior tolerância em estresse agudo e crônico (como a mutação *cyr^{A474T} + Δath1* e populações evoluídas), podem gerar um trade-off entre crescimento e tolerância à estresse, o que reflete a dificuldade de crescimento em meio sem inibidor.. Outros estudos são necessários para elucidar a associação das rotas envolvidas no processo de tolerância a partir dos alelos mutados que apareceram no curso do experimento, sendo importante aplicar outras avaliações fenotípicas, como quantificação de expressão gênica e fermentações com os mutantes e linhagens construídos, podendo gerar um conhecimento de aplicação prática na indústria no bioetanol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V., LOPES, M.L., DE CASTRO OLIVEIRA, J. V., BUCKERIDGE, M.S., & GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G. A. Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. **FEMS Yeast Research**, vol. 9, p. 1208–1216, 2009.

BARRICK, E. J., LENSKI, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. **Nature Review Genetics**, v. 14, p 827-839, 2013.

BASSO, L.C., DE AMORIM, H.V., DE OLIVEIRA A. J., LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p.1155-1163, 2008.

BASSO, L.C, BASSO, T.O., ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Bernardes MAS (ed) **Biofuel production—recent developments and prospects**. Intech, Rijeka, pp 85–100, 2011.

BLOUNT, Z. D., LENSKI, R. E., LOSOS, J. B. . Contingency and determinism in evolution: Replaying life's tape. **Science**, v. 362, p. 1-12, 2018.

COSTA, V., REIS, E., QUINTANILHA, A., MORADAS-FERREIRA, P. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 608–614, 1993.

CONRAD, M., SCHOTHORST, J., KANKIPATI, H. N., ZEEBROECK, G. V., TEIXEIRA-RUBIO, M. THEVELEIN, J.M. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.38, p. 254-299, 2014.

DELLA-BIANCA, B.E.; BASSO, T.O., STAMBUK, B.U., BASSO, L.C., GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 979-991, 2013.

DELUNA, A., VETSIGIAN, K., SHORESH, N. HEGRENESS, M., GONZÁLEZ-CÓLON, M. CHAO, S., KISHONY, R. Exposing the fitness contribution of duplicated genes. **Nature Genetics**, v. 40, p. 676-81, 2008.

DING, J., HUANG, X., ZHANG, L., ZHAO, N., YANG, D., ZHANG, K. Tolerance and stress response to ethanol in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 256-263, 2009.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.177-182, 2006.

GAROMA, T., BEN-KHALED, M., BEYENE, A. Comparative resource analyses for ethanol produced from corn and sugarcane in different climatic zones. **International Journal of Energy Research**, v. 36, p. 1065–1076, 2011.

GIETZ, R.D., WOODS, R. A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. **Methods in Molecular Biology**, v.313, p.107-120, 2006.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, p. 808-810, 2007.

HONG, K.; HOU, X.; HAO, A.; WANG, P.; FU, X.; LV, A.; DONG, J. Truncation of *CYR1* promoter in industrial ethanol yeasts for improved ethanol yield in high temperature condition. **Process Biochemistry**, vol. 65, p.37-45, 2018.

LIDA, H. Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 8, p. 5555–5560, 1988.

JACOBUS, A.P, GROSS J.; Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. **PLoS ONE** v. 10, n. 3, 2015.

KAINO, T, TAKAGI, H. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 273– 283, 2008.

KIM, J.; ALIZADEH, P.; HARDING, T.; HEFNER-GRAVINK, A.; KLIONSKY, D. J. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 62, p.1563-1569, 1996.

LI, S.; GIARDINA, D. M.; SIEGAL, M. L. Control of nongenetic heterogeneity in growth rate and stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by cyclic AMP- regulated transcription factor. **PLoS Genetics**, v. 14, 2018.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001.

MA, P., GONÇALVES, T; MARETZEK, A.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; THEVELEIN, J.M. The lag phase rather than the exponential-growth phase on glucose is associated with a higher cAMP level in wild-type and cAPK attenuated strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, vol. 143, p. 3451–3459, 1997.

MA, M., LIU, L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 829-845, 2010.

MADIGAN, M. T., MARTINHKO, J., DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MANSURE, J.J.C., PANEK, A.D., CROWE, L.M., CROWE, J.H. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1191, p. 309–316, 1994.

OGAWA, Y., NITTA, A., UCHIYAMA, H., IMAMURA, T., SHIOMOI, H., ITO, K. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 313–320, 2000.

PAÍS confirma recorde histórico na produção de etanol: 35,6 bilhões de litros na safra 2019/20. **CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento**, 23 de Abril de 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20>>. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2021.

PEREIRA, F. B., GUIMARÃES, P. M. R. , TEIXEIRA, J. A. , DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, p. 130–136, 2011

STANLEY, D., BANDARA, A., FRASER, S., CHAMBERS, P.J., STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 13-24, 2010.

THEVELEIN, J. M., de WINDE, J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.33, p. 904-918, 1999.

TROTT, A., MORANO, K.A. The Yeast response to heat shock. In **Yeast Stress Responses**. ed. Hohmann, S. and Mager, P.W.H. p. 172–200. Berlin: Heidelberg Springer, 2003.

VENTURINI FILHO, W. G.. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. Volume 1. São Paulo: Blucher, 2010.