UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

DAVID BATISTA MAUÉS

**Caracterização funcional da superexpressão do fator de transcrição Azf1
na produção de celulasas por *Trichoderma reesei***

RIBEIRÃO PRETO – SP
2021

DAVID BATISTA MAUÉS

**Caracterização funcional da superexpressão do fator de transcrição Azf1
na produção de celulases por *Trichoderma reesei***

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD)

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de Concentração: Bioquímica

**Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento
Silva**

**Coorientadora: Dra. Amanda Cristina Campos
Antoniêto**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Maués, David Batista

Caracterização funcional da superexpressão do fator de transcrição Azf1 na produção de celulases por *Trichoderma reesei*. Ribeirão Preto, 2021.

100 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva.

Coorientadora: Dra. Amanda Cristina Campos Antoniêto

1. *Trichoderma reesei*. 2. Celulases. 3. Fator de transcrição. 4. Azf1. 5.

MAUÉS, D.B. **Caracterização funcional da superexpressão do fator de transcrição Azf1 na produção de celulasas por *Trichoderma reesei***. 2021. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio incondicional nessa minha trajetória. Obrigado por sempre apoiar minhas escolhas e pelo incentivo em todos esses anos. Sem vocês nada disso seria possível, muito obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Nascimento Silva. Muito obrigado por permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa mesmo sem me conhecer. Tem sido uma experiência muito enriquecedora tanto pessoal quanto profissionalmente. Obrigado por todas as oportunidades (e também pelos vinhos)!

À minha coorientadora, Dra. Amanda Antoniêto, que esteve comigo desde o começo desse trabalho. “Pegou na minha mão” e foi me ensinando tudo sobre biologia molecular, *Trichoderma*, receitas de risoto, enfim. Muito obrigado por todos esses ensinamentos e discussões científicas, és uma grande inspiração e você merece o mundo!

À minha amiga mais parceira Iasmin, muito obrigado por ter estado ao meu lado durante esses anos. Tua amizade fez eu me sentir em casa. Obrigado por compartilhar os vários rolês, histórias e os dramas da vida de mestrando. Um dia seremos hokages!

Ao moço Matheus Henrique, não consigo dizer como sou grato de ter você ao meu lado nesses últimos meses. Muito obrigado por estar comigo, sempre me ouvindo, conversando sobre tudo, me apoiando, tornando tudo melhor e mais leve.

À família LBM: Alinne, Amanda, Cláudia, Iasmin, Karol, Letícia, Luiz, Marcus e Vanessa. Muito obrigado por me acolherem tão bem, por toda ajuda nos experimentos, pela troca de conhecimentos, pelos cafezinhos da tarde e pelos Toco's que tanto fomos. Vocês tornam os dias de trabalho bem melhores, divertidos e prazerosos. Também gostaria de agradecer aos que não estão mais no laboratório: Renato, Douglas, Wellington, Lili, Mari Costa e Mari Zerbini, que sempre estão dispostos a ajudar e que fazem muita falta. Todos são muito especiais!

Aos alunos e professores do Departamento de Bioquímica, por toda ajuda e por disponibilizarem seus laboratórios para a realização dos experimentos. Especialmente ao Dr. Jhonatan Maraschin e ao Dr. Diego Duarte, pela ajuda nos

experimentos impossíveis de Western Blot, e ao Matheus Quintana, sempre ajudando nas dúvidas de biologia molecular. Aos colaboradores do *São Paulo Fungal Group*, especialmente aos membros dos Laboratório de Biologia Sintética e Sistema e Laboratório de Biologia Molecular aplicada as Ciências Farmacêuticas, por todas as contribuições na realização desse trabalho.

Às técnicas do Departamento de Bioquímica, especialmente Zu, Silvia, Vera, Odete, Cacilda e Silvinha, por toda ajuda, suporte, pelos cafés, por serem sempre tão prestativas e alegrarem nossos dias, muito obrigado!

Aos meus outros amigos de Ribeirão Preto: Henrique, Léo, Israel, Lucas. Muito obrigado pela companhia nos rolês, risadas e pelas conversas. Aos meus amigos de São Carlos, especialmente ao Luís, Henrique e Lucas, sempre tão receptivos, obrigado por deixarem minha vida em São Paulo mais leve e divertida!

Aos meus amigos de longa data que estão no Pará (ou espalhados por aí): Biotops, Pilantras, Salsicheiros, Patricinhas.... Muito obrigado por todo apoio, por sempre me ouvirem, pelas conversas e pelas diversões!

À Maria Ivone, por ser eficiente, prestativa e por ajudar em todos os momentos que foi necessário.

Um agradecimento especial às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho, muito obrigado!

*"I gotta keep trying, gotta keep my head held high
There's always gonna be another mountain
I'm always gonna wanna make it move
Always gonna be an uphill battle
Sometimes I'm gonna have to lose
Ain't about how fast I get there
Ain't about what's waiting on the other side
It's the climb"
Miley Cyrus – The Climb*

*"Em épocas sombrias, temos que nos dar
esperança. Esse é o sentido da força interior."
Tio Iroh (Avatar: a lenda de Aang)*

RESUMO

MAUÉS, D.B. **Caracterização funcional da superexpressão do fator de transcrição Azf1 na produção de celulases por *Trichoderma reesei***. 2021. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O fungo *Trichoderma reesei* é um dos principais produtores de enzimas celulolíticas que atuam na degradação da biomassa lignocelulósica, a fonte renovável mais abundante da Terra e matéria-prima para produção de bioetanol. O sistema celulolítico de *T. reesei* está sob controle de uma série de fatores de transcrição que regulam de forma eficiente a produção dessas enzimas, entre eles está o regulador positivo Azf1. O objetivo desse trabalho foi contribuir para a compreensão do papel de Azf1 na regulação da expressão gênica de celulases no fungo *T. reesei* através da sua superexpressão. Para isso, foi construído um vetor onde o gene *azf1* esteve sob controle do promotor constitutivo *Pcdna1*, que superexpressou Azf1 em condições indutoras e repressoras da produção de celulases. A superexpressão de Azf1 não ativou a transcrição de celulases em glicose, enquanto que em celulose, nos estágios iniciais de cultivo, aumentou a expressão da proteína *Swollenin* e das β -glicosidases *cel1a*, *cel1b* e *cel3b*. Esse aumento na produção dessas β -glicosidases, por sua vez, resultou em um aumento da taxa de hidrólise da celobiose, que ativou a CCR e levou à repressão dos genes de celulases e do fator de transcrição Xyr1 nos estágios mais tardios do cultivo. Além disso, a superexpressão de Azf1 causou um aumento na atividade de celulases em *T. reesei* em cultivo em celulose e bagaço-de-cana. Assim sendo, esse trabalho apresentou novos papéis de Azf1 na regulação da expressão de celulases em *T. reesei*, contribuindo para o desenvolvimento de linhagens com maior produção de celulases.

Palavras-chave: 1. *Trichoderma reesei*. 2. Celulases. 3. Fator de transcrição. 4. Azf1. 5. Superexpressão.

ABSTRACT

MAUÉS, D.B. **Functional characterization of the overexpression of Azf1 transcription factor in cellulase production by *Trichoderma reesei***. 2021. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The fungus *Trichoderma reesei* is one of the main producers of cellulolytic enzymes that act in the degradation of lignocellulosic biomass, the most abundant renewable source on Earth and the raw material for the production of bioethanol. *T. reesei*'s cellulolytic system is under control of several transcription factors that efficiently regulate the production of these enzymes, among them is the positive regulator Azf1. The aim of this work was to contribute to the understanding of the role of Azf1 in the regulation of cellulase gene expression in the fungus *T. reesei* through its overexpression. For this, a vector was built where the *azf1* gene was under the control of the constitutive promoter *Pcdna1*, which overexpressed Azf1 in inducing and repressive conditions of cellulase production. The overexpression of Azf1 did not activate the transcription of cellulases in glucose, while in cellulose, in the early stages of cultivation, the expression of the protein *Swollenin* and β -glucosidases *cel1a*, *cel1b* and *cel3b* increased. This increase in the production of these β -glucosidases, in turn, caused an increase in the hydrolysis rate of cellobiose, which activated the CCR and caused repression of the cellulase genes and the transcription factor Xyr1 in the later stages of cultivation. In addition, the overexpression of Azf1 caused an increase in the activity of cellulases in *T. reesei* in cultivation in cellulose and sugarcane bagasse. Therefore, this work presented new roles for Azf1 in the regulation of the cellulase expression in *T. reesei*, contributing to the development of strains with greater production of cellulases.

Keywords: 1. *Trichoderma reesei*. 2. Cellulases. 3. Transcription factor. 4. Azf1. 5. Overexpression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da lignocelulose. O principal componente da parede celular de plantas é a celulose, um polissacarídeo formado por unidades repetidas de glicose unidas através de ligações $\beta(1,4)$. O dissacarídeo celobiose, formado pela união de dois resíduos de glicose, é a menor unidade de repetição da celulose. As fibras de celulose naturalmente possuem regiões cristalinas (altamente ordenadas) e amorfas ou paracristalinas (pouco ordenadas). Fonte: Adaptado de Department of Energy Office of Science (2005). 22
- Figura 2.** O complexo holocelulolítico de *T. reesei*. As CBHs Cel7a e Cel6a, as endoglicanases, LMPOs e a proteína Swollenin atuam de forma sinérgica para despolimerizar a celulose e as β -glicosidases hidrolisam a celobiose para produzir glicose. Diversas hemicelulases atuam na hidrólise do heteropolímero hemicelulose. Fonte: Adaptado de Paula et al, 2018. 27
- Figura 3.** Mapa do plasmídeo pLMcdna. 39
- Figura 4.** Representação esquemática das etapas de transformação do fungo e seleção dos transformantes. 43
- Figura 5.** Digestão do plasmídeo pLMcdna. 1: Digestão com a enzima Sall. 2: Digestão com a enzima SbfI. M: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) 55
- Figura 6.** Plasmídeo pPcdna1-azf1. (A) Representação esquemática do cassete de expressão pPcdna1-azf1. Azf1 foi inserido entre os sítios de Sall e SbfI. Pcdna1, promotor do gene cdna1; HygR, gene da higromicina β transferase; AmpR, gene β lactamase. (B) Perfil de digestão enzimática de pPcdna1-azf1: 1) Plasmídeo fechado; 2) Plasmídeo linearizado após digestão com Sall; 3) Plasmídeo digerido com XhoI e Sall; 4) Plasmídeo digerido com Sall e SbfI; 5) Amplificação do gene azf1 por PCR. M: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) 56
- Figura 7.** Confirmação da integração do vetor pPcdna1-azf1 ao genoma de *T. reesei*. (A) Representação esquemática da estratégia de verificação dos transformantes. (B) Amplificação da ORF da higromicina. (C) Amplificação de parte do cassete Pcdna1-azf1. C+: controle positivo (plasmídeo pPcdna1-azf1). B: branco, sem DNA. M: Marcador de peso molecular. 58
- Figura 8.** Expressão gênica absoluta de azf1 nas linhagens QM6a e CA3. (A) As linhagens QM6a e CA3 foram cultivadas em celulose 1% por 24h, 48h e 72h. (B) As linhagens QM6a e CA3 foram pré-cultivadas em glicerol por 24h e os micélios transferidos para celulose e cultivados por 24h. As linhagens QM6a e CA3 foram cultivadas em glicose por 24h. p (*) p $\leq 0,05$ 59

- Figura 9.** Expressão gênica absoluta de *azf1* nas linhagens QM9414 e 4CA1. As linhagens QM9414 e 4CA1 foram pré-cultivadas em glicerol por 24h e os micélios transferidos para celulose e cultivados por 8 e 24h. Os esporos também foram utilizados diretamente no cultivo em glicose (24h) e celulose (24h e 48h) (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 60
- Figura 10.** Análise do crescimento das linhagens QM9414 e 4CA1 em diferentes fontes de carbono. (A) As linhagens foram crescidas em glicerol 1% (v/v) por 24h. (B) As linhagens foram crescidas em diferentes fontes de carbono (1% p/v) por 24h. 61
- Figura 11.** Efeitos da superexpressão de *Azf1* no cultivo em glicose. (A) Expressão absoluta dos genes celulolíticos. (B) Western Blot para detecção de *Azf1* nos extratos intracelulares das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em glicose. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 62
- Figura 12.** Expressão gênica de holocelulases em celulose. (A-J) Genes relacionados 64
- Figura 13.** Expressão gênica dos fatores de transcrição *Xyr1* (A) e *Cre1* (B). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 65
- Figura 14.** Fatores de transcrição regulados por *Azf1*. (A) Possíveis sítios de ligação para *Azf1* nos promotores dos fatores de transcrição diferencialmente expressos no RNA-Seq (p -valor $\leq 0,0001$). (B-E) Expressão gênica dos fatores de transcrição. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 67
- Figura 15.** O fator de transcrição *Tr4921*. (A) Motivo de ligação de *Tr4921* predito por bioinformática. (B) Possíveis sítios de ligação de *Tr4921* nos promotores dos genes analisados na PCR em tempo real (p -valor $\leq 0,0001$). 68
- Figura 16.** O fator de transcrição *Tr58456*. (A) Alinhamento entre as sequências de *Tr58456* e *UPC2*, seu homólogo em *S. cerevisiae*, na região de ligação do DNA (caixa preta). Os resíduos de cisteína estão destacados em vermelho. (B) Motivo de ligação do *UPC2*. (C) Possíveis sítios de ligação para *UPC2* nos promotores dos genes de celulasas avaliados na PCR em tempo real (p -valor $\leq 0,0001$). 69
- Figura 17.** Atividades enzimáticas no sobrenadante do cultivo das linhagens QM9414 e 4CA1 em glicerol, celulose e glicose (A-E). (A) Celobiohidrolase (B) CMCase (C) β -glicosidase (D) β -xilosidase (E) Xilanase (F) Concentração de proteínas no sobrenadante do cultivo em celulose. 71
- Figura 18.** SDS-Page para visualização do secretoma das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 24h. 72
- Figura 19.** *Azf1* regula positivamente a produção de β -glicosidasas intracelulares. (A) Possíveis sítios de ligação para *Azf1* nos promotores dos genes *cel1a* e *cel1b*. (B) Expressão gênica de *cel1a*. (C) Expressão gênica de

cel1b. (D) Atividade de β -glicosidase do extrato intracelular das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 24h (pré-crescidas em glicerol). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 73

Figura 20. Atividade enzimática das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 96h. (A) Celobiohidrolase (B) CMCase (C) β -glicosidase (D) β -xilosidase (E) Xilanase. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 75

Figura 21. Atividade enzimática das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em bagaço-de-cana por 96h. (A) Celobiohidrolase (B) CMCase (C) β -glicosidase (D) β -xilosidase (E) Xilanase. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$ 76

Figura 22. Modelo hipotético dos mecanismos regulatórios causados pela superexpressão de Azf1 (Azf1⁺). (A) Em glicose, Azf1⁺ ativa a transcrição da celulase Cel45a e do fator de transcrição Tr4921 e reprime a expressão de Tr58456. Tr4921 também pode ativar a transcrição de Cel45a. (B) A ação sinérgica de endo e exoglicanases libera celobiose que é transportada para o citosol. Azf1⁺ aumenta a produção de celulases, especialmente das β -glicosidases intracelulares Cel1a e Cel1b, que hidrolisam a celobiose. A glicose resultante ativa a CCR e Cre1 move-se para o núcleo, onde reprime a expressão de celulases e o principal ativador Xyr1. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reações de digestão enzimática para confirmação do plasmídeo pPcdna1-azf1	39
Tabela 2. Primers utilizados para confirmação dos transformantes.....	45
Tabela 3. Primers utilizados na análise da expressão gênica por qRT-PCR...	47
Tabela 4. Fatores de transcrição diferencialmente expressos no RNA-Seq. FC: log2 Fold change. BC: bagaço-de-cana. G: glicerol. DE: diferença entre FC TU6 e FC Δ azf1.	52

LISTA DE SIGLAS

AA: do inglês, *Auxiliar activity*

Ace1: do inglês, *Activator of cellulase expression 1*

Ace2: do inglês, *Activator of cellulase expression 2*

Ace3: do inglês, *Activator of cellulase expression 3*

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ANP: Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis

Azf1: do inglês, *Asparagine-rich zinc finger 1*

BGL: β -glicosidase

BglR: do inglês, *Beta-glucosidase regulator*

BLAST: do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: do inglês, *Bovine Serum Albumin*

CAZymes: do inglês, *Carbohydrate-active enzymes*

CBH: celobiohidrolase

CCR: do inglês, *Carbon catabolite repression*

CDH: celobiose desidrogenase

cDNA: DNA complementar

ChIP-qPCR: Imunoprecipitação de Cromatina acoplada à PCR quantitativa

Clp1: do inglês, *CTI6-like protein 1*

Clr1: do inglês, *Cellulase degradation regulator 1*

CMC: Carboximetilcelulose

Cre1: do inglês, *Carbon catabolite repressor 1*

Crt1: do inglês, *Cellulose responsive transporter 1*

Crz1: do inglês, *Calcineurin-responsive zinc finger 1*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNS: ácido dinitrosalicílico

EGL: endoglicanase

FC: do inglês, *fold change*

FT: fator de transcrição

GH: Glicosídeo hidrolase

HAP: do inglês, *Heme-activated proteins*

Hph: do inglês, *hygromycin B phosphotransferase*

LPMO: do inglês, *Lytic Polysaccharide Monooxygenase*

MA: Mandels-Andreotti

MEX: do inglês, *Malt extract*

ORF: do inglês, *Open reading frame*

PCR: do inglês, *Polymerase chain reaction*

PkC: Proteína quinase C

pNPC: do inglês, *p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside

pNPG: do inglês, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside

pNPXyl: do inglês, *p*-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside

PWM: do inglês *Position weight matrix*)

qRT-PCR: PCR quantitativa em Tempo Real

Rce1: do inglês, *Repressor of cellulase expression 1*

RNA: Ácido Ribonucleico

RNA-Seq: Sequenciamento de RNA de nova geração

Rxe1: do inglês, *Regulator of Xyr1 expression 1*

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SRE: do inglês, *Sterol regulatory element*

SREBP: do inglês, *Sterol regulatory element binding proteins*

SxIR: do inglês, *Specific xylanase regulator*

TCA: Ácido tricloroacético

Vib1: do inglês, *Vegetative incompatibility blocked 1*

Xpp1: do inglês, *Xylanase promoter-binding protein 1*

Xyr1: do inglês, *Xylanase regulator 1*

ZF: do inglês, *zinc finger*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1. A biomassa lignocelulósica	22
2.2. Enzimas lignocelulolíticas.....	23
2.3. O sistema celulolítico de <i>T. reesei</i>.....	25
2.4. Regulação transcricional da expressão de holocelulases	28
2.5. O fator de transcrição Azf1.....	32
3. OBJETIVOS.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Construção do vetor de expressão	38
4.2. Propagação do vetor pPcdna1-azf1 utilizando <i>Escherichia coli</i> DH5α	40
4.2.1. Obtenção de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α	40
4.2.2. Transformação de <i>E. coli</i> DH5α com o plasmídeo pPcdna1-azf1	40
4.2.3. Extração de DNA plasmidial em média escala (Midiprep).....	40
4.3. Transformação das linhagens de <i>T. reesei</i> QM6a e QM9414.....	41
4.3.1. Obtenção dos protoplastos.....	42
4.3.2. Transformação do fungo	42
4.3.3. Seleção dos transformantes positivos	43
4.3.4. Extração do DNA genômico	44
4.3.5. Confirmação da integração do plasmídeo pPcdna1-azf1	44
4.4. Análise do crescimento em diferentes fontes de carbono	45
4.5. Cultivo em glicose e celulose	46
4.6. Análise da expressão gênica por qRT-PCR	46
4.7. Atividade enzimática.....	47
4.7.1. Atividade de endo-1,4-β-glicanase (CMCase).....	48
4.7.2. Atividade de endo-1,4-β-xilanase	48
4.7.3. Atividade de β-glicosidase.....	48
4.7.4. Atividade de β-xilosidase.....	49
4.7.5. Atividade de celobiohidrolase.....	49
4.8. Dosagem de proteínas e Eletroforese (SDS-Page).....	49
4.9. Extração de proteínas intracelulares.....	50
4.10. Western Blot	50

4.11. Produção de celulases em presença de celulose e bagaço-de-cana	51
4.12. Análise das redes regulatórias mediadas por Azf1	52
4.13. Análises estatísticas	53
5. RESULTADOS	55
5.1. Construção do vetor pPcdna1-azf1	55
5.2. O vetor pPcdna1-azf1 foi integrado com sucesso ao genoma de <i>T. reesei</i>	57
5.3. Análise da expressão de <i>azf1</i> nos mutantes obtidos	58
5.4. Análise do crescimento em diferentes fontes de carbono	60
5.5. Análise da expressão gênica de holocelulases	61
5.5.1. A superexpressão de Azf1 não afeta a expressão de celulases no cultivo em glicose	62
5.5.2. A superexpressão de Azf1 reprime a expressão de celulases	63
5.5.3. Análise da expressão gênica dos reguladores Xyr1 e Cre1	65
5.5.4. Análise das redes regulatórias mediadas por Azf1	66
5.6. Dosagem de proteínas e atividade enzimática	70
5.7. A superexpressão de Azf1 aumenta a produção de β -glicosidases intracelulares	72
5.8. A superexpressão de Azf1 aumenta a produção de celulases a longo prazo	74
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A população mundial continua a crescer com uma projeção de chegar a 8,5 bilhões em 2030 e 9,5 bilhões em 2050. Concomitante com o crescimento populacional, a demanda por energia também tem crescido, sendo estimado um aumento de até 48% no consumo até 2040 (Baruah *et al.*, 2018; Sagastume Gutiérrez *et al.*, 2020). Essa enorme demanda por energia é suprida por combustíveis fósseis como gás natural, carvão, óleo de petróleo e seus derivados, como gasolina e diesel, o que gera diversos impactos ambientais, como poluição do ar, da água e do solo (Peña-Castro *et al.*, 2017). Por isso, somado à futura escassez dessa matéria-prima, buscam-se alternativas sustentáveis para produção de energia e os biocombustíveis têm ganhado grande destaque nas últimas décadas.

Os biocombustíveis utilizam uma fonte renovável – biomassa – para produzir energia. Dentre eles, destaca-se o etanol, produzido principalmente a partir da cana-de-açúcar e milho, sendo as maiores contribuições na indústria de bioenergia (Kilbane, 2016). O Brasil foi o pioneiro a implantar o etanol como combustível nas atividades de transporte. As primeiras tentativas de incluir o etanol na matriz energética brasileira aconteceram no início do século XX, com o intuito de amenizar os efeitos da crise do setor açucareiro e as importações de petróleo. Porém, foi em 1975 que essas políticas alavancaram com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). O sucesso desse biocombustível no país ocorreu devido à redução drástica dos custos de sua produção e ao aumento dos preços internacionais do petróleo, além da flexibilidade dos veículos que puderam começar a utilizá-lo, possibilitando ao etanol competir com a gasolina. O Brasil é um grande produtor de etanol, tendo produzido entre 2012-2019 cerca de 90 bilhões de litros, segundo dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis (ANP) (Amorim *et al.*, 2011; Leite e Cortez, 2008; Peña-Castro *et al.*, 2017).

Apesar disso, uma questão polêmica em torno do etanol é o fato de a matéria-prima ser cultivada em terrenos agriculturáveis, reduzindo a disponibilidade de alimentos e os encarecendo (Sarsekeyeva *et al.*, 2015). Como a demanda por esse combustível é crescente, busca-se novas tecnologias para aproveitar a totalidade de açúcares da planta, utilizando resíduos da agricultura,

como o material lignocelulósico, produzindo assim o etanol de segunda geração (2G), conhecido como bioetanol. Segundo dados do Ministério de Minas e Energia, em seu Plano Nacional de Energia 2030, o Brasil é um grande gerador de biomassa, com uma projeção para 2030 de 1403 milhões de toneladas apenas de biomassa residual. Portanto, há muita biomassa disponível a ser utilizada e a produção de etanol 2G a partir dela é uma forma promissora para gerar energia.

Para tornar o etanol 2G economicamente viável, há alguns desafios a superar. Para produzi-lo, é necessário primeiramente hidrolisar a biomassa lignocelulósica para disponibilizar os açúcares fermentescíveis aos microrganismos fermentadores que, então, os converterão a etanol. Essa hidrólise pode ser realizada por um conjunto de enzimas, denominadas celulasas e hemicelulasas, que degradam, respectivamente, celulose e hemicelulose, principais componentes da biomassa lignocelulósica, até a glicose. Entretanto, essas enzimas ainda apresentam um alto custo, representando em torno de 20% dos custos de produção do etanol 2G, o que inviabiliza sua produção (Paula, *et al.*, 2019; Philippini *et al.*, 2020; Pino *et al.*, 2018).

A fim de desenvolver sistemas que possam subsidiar a produção de celulasas, buscaram-se fontes mais acessíveis das mesmas. Nesse contexto, o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* ganha destaque. Esse fungo é um grande produtor de celulasas, possuindo um dos mais inteligentes sistemas celulolíticos, capaz de converter a celulose em glicose devido ao alto sinergismo de suas enzimas (Santos Castro, *et al.*, 2016).

O sistema celulolítico de *T. reesei* está sob a regulação de uma série de fatores de transcrição (FT) que controlam a expressão desses genes em diferentes condições. Devido a esse papel crucial, fatores de transcrição tem sido alvo de diferentes estratégias de engenharia genética para melhorar a produção de celulasas em *T. reesei* e outros fungos celulolíticos. Recentemente, nosso grupo identificou e caracterizou em *T. reesei* um novo fator de transcrição, Azf1 (*Asparagine-rich zinc finger 1*), que regula positivamente a expressão de celulasas (Antonieto *et al.*, 2019). No presente trabalho, a superexpressão de Azf1 permitiu uma melhor compreensão de seu papel na produção de celulasas por *T. reesei*, contribuindo para a construção de linhagens mais eficientes quanto à produção de enzimas celulolíticas.

Referencial teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é a mais abundante fonte renovável no planeta Terra, com uma produção global de até 1,3 bilhões de toneladas por ano. Pode ser derivada de resíduos agroindustriais, resíduos municipais ou subprodutos da agricultura e silvicultura e pode ser utilizada como matéria-prima em diversas aplicações na biorrefinaria, como biocombustíveis, químicos finos e outros produtos de valor agregado (Baruah *et al.*, 2018; Häkkinen *et al.*, 2012; Paula, de *et al.*, 2019). Como principal componente estrutural da parede celular das plantas, sua composição precisa é altamente complexa e varia de acordo com a espécie vegetal, tipo de tecido, estação do ano e localização geográfica (Benocci *et al.*, 2017). A estrutura da lignocelulose pode ser observada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura da lignocelulose. O principal componente da parede celular de plantas é a celulose, um polissacarídeo formado por unidades repetidas de glicose unidas através de ligações $\beta(1,4)$. O dissacarídeo celobiose, formado pela união de dois resíduos de glicose, é a menor unidade de repetição da celulose. As fibras de celulose naturalmente possuem regiões cristalinas (altamente ordenadas) e amorfas ou paracristalinas (pouco ordenadas). Fonte: Adaptado de Department of Energy Office of Science (2005).

A lignocelulose consiste em três componentes principais: a celulose (35-50%), hemicelulose (20-30%) e lignina (5-30%), que juntos representam cerca de 80% do peso seco da planta (Ali *et al.*, 2019). A celulose e hemicelulose juntas constituem a holocelulose, que é revestida pela lignina. A lignina possui uma estrutura complexa, formada através da polimerização de três monômeros fenólicos cuja abundância relativa é variável entre as espécies vegetais: álcool p-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Devido sua estrutura aromática e altamente ramificada, a lignina é altamente resistente à degradação e é responsável por sustentar as fibras celulósicas e pela rigidez da parede celular (Feofilova e Mysyakina, 2016; Norgren e Edlund, 2014; Pereira Jr, Couto e Anna, 2008).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da natureza, encontrado na parede celular de vegetais. É um homopolímero, composto de monômeros de D-glicose conectados por ligações glicosídicas β -1,4, sendo o dissacarídeo celobiose a menor unidade de repetição da celulose que pode ser convertida em resíduos de glicose. A celulose é um polímero linear e não-ramificado, fibroso, resistente e insolúvel em água. Estudos físico-químicos demonstraram que as fibras de celulose naturalmente possuem regiões cristalinas (altamente ordenadas) e amorfas ou paracristalinas (pouco ordenadas), sendo essas mais suscetíveis a hidrólise (Figura 1) (Anwar, Gulfranz e Irshad, 2014; Zeng, Himmel e Ding, 2017).

Diferente da celulose, a hemicelulose é um polímero altamente diversificado e ramificado. A cadeia de hemicelulose é composta de diferentes polissacarídeos unidos por ligações β (1,4) ou β (1,3): xilana, galactomanana, glucuroxilana, arabinoxilana, glucomanana e xiloglucana. Esses polissacarídeos também são bastante diversos, sendo compostos por diferentes açúcares, tais como: D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico (Baruah *et al.*, 2018; Samal *et al.*, 2017).

2.2. Enzimas lignocelulolíticas

Devido sua estrutura complexa, a degradação da biomassa lignocelulósica até açúcares fermentescíveis depende de um conjunto de enzimas, chamadas de enzimas lignocelulolíticas, compostas de celulasas,

hemicelulases e enzimas modificadoras da lignina. A degradação enzimática da lignocelulose é mais vantajosa que o tratamento químico convencional, pois enzimas são recicláveis, altamente específicas e mais sustentáveis ao meio ambiente (Juturu e Wu, 2014; Zhang, F. *et al.*, 2019).

Três classes de enzimas compõem as celulases: (a) endo- β -1,4-glicanases (EGL) (E.C. 3.2.1.4), que catalisam a clivagem de ligações β -1,4-glicosídicas internas das cadeias de celulose, gerando cadeias de glicanos de diferentes tamanhos; (b) exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (CBH) (E.C. 3.2.1.91), que agem na ponta das cadeias de celulose, liberando β -celobiose; e (c) β -1,4-glicosidases (BGL) (E.C. 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose produzindo, por fim, glicose (Kuhad, Gupta e Singh, 2011).

As celulases estão agrupadas, de acordo com suas estruturas, nas famílias de glicosídeo hidrolases (GH) que estão depositadas no banco de dados *Carbohydrate-active enzymes* (CAZymes). As endoglicanases são encontradas nas famílias GH 5–8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 e 128. Exoglicanases ou celobiohidrolases são encontradas nas famílias GH 5–7 e 48 e β -glicosidases nas famílias GH 1, 3, 4, 17, 30 e 116 (Häkkinen *et al.*, 2012; Juturu e Wu, 2014).

Além destas, outras proteínas envolvidas na degradação de celulose estão sendo descritas. Um grupo dessas proteínas é denominado LPMO (*Lytic Polysaccharide Monooxygenase*), altamente expressas em fungos e agrupadas na família GH61 e AA9-11 e AA13-16 (AA, *Auxiliar activity*). LPMOs clivam ligações glicosídicas da celulose e outros polissacarídeos através de um mecanismo oxidativo, na presença de átomos de oxigênio e de um doador de elétrons extracelular, que pode ser uma enzima denominada celobiose desidrogenase (CDH). Utilizando este método, LPMOs e CDHs tornam a celulose mais acessível às celulases, aumentando a eficiência da hidrólise (Filiatrault-Chastel *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017; Quinlan *et al.*, 2011).

A *swollenin* (*swo*), cuja sequência é similar à de expansinas (proteínas da parede celular vegetal que quebram a ligação de hidrogênio entre os polissacarídeos da parede celular sem hidrolisá-los), é uma proteína encontrada em fungos. Ensaios de atividade dessa proteína mostraram que ela também rompe a estrutura das paredes celulares sem produzir quantidades detectáveis de açúcares redutores (Saloheimo *et al.*, 2002).

Hemicelulases compreendem um grande grupo de enzimas hidrolíticas e não-hidrolíticas que cooperativamente degradam a hemicelulose. As principais hemicelulases são endo-1,4- β -xilanases, (EC 3.2.1.8), β -xilosidases (EC 3.2.1.37), α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), β -mananase (EC 3.2.1.78), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139) e acetil-xilana esterase (EC 3.2.1.72). Outras glicosídeo hidrolases e carboidrato esterases atuam sobre a hemicelulose para desconstruí-la. As enzimas que atuam sobre a lignina são principalmente compostas por lacases (EC 1.10.3.2), e três peroxidases: lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) e peroxidase versátil (EC 1.11.1.16) (Bajaj e Mahajan, 2019; Zhang, F. *et al.*, 2019).

Esse conjunto de enzimas atua de forma sinérgica para despolimerizar a biomassa lignocelulósica e assim liberar os açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados na produção de bioetanol e outros produtos de valor agregado. Porém, o custo de produção dessas enzimas torna seu uso inviável em diversos processos. Portanto, existe uma enorme demanda por microrganismos que possam produzi-las de forma economicamente viável, sendo fungos degradadores da biomassa uma fonte promissora destas enzimas.

2.3. O sistema celulolítico de *T. reesei*

Dentre os microrganismos comumente utilizados na produção de enzimas lignocelulolíticas, os fungos filamentosos possuem uma posição de destaque e o gênero *Trichoderma* vem sendo amplamente utilizado pela civilização humana na indústria e na agricultura (Schmoll *et al.*, 2016). Dentre as espécies pertencentes a este gênero, o fungo saprofítico *T. reesei* é o mais bem estudado pois é considerado o principal produtor de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal (Novy *et al.*, 2019).

T. reesei foi isolado pela primeira vez durante a Segunda Guerra Mundial, devido sua capacidade de deteriorar os tecidos de algodão pertencentes ao exército dos Estados Unidos nas Ilhas Salomão. Foi inicialmente identificado como *Trichoderma viride* e nomeado QM6a. Mais tarde, foi reconhecido que a linhagem difere de *T. viride*, então nomeou-se *T. reesei* em homenagem a Elwyn T. Reese e também se mostrou um bom produtor de celulases (Mandels e Reese, 1957; Peterson e Nevalainen, 2012). Ainda, por meio de marcadores

filogenéticos, verificou-se que *T. reesei* é o anamorfo (forma reprodutiva assexual) de *Hypocrea jecorina* (teleomorfo, forma reprodutiva sexual), indicando que são indistinguíveis e pertencentes à mesma espécie. Baseado na predominância em publicações e patentes e no voto da comunidade científica, *T. reesei* é o nome que deve ser utilizado (Schmoll *et al.*, 2016; Seiboth, Ivanova e Seidl-Seiboth, 2011).

Como mencionado, *T. reesei* possui uma alta habilidade de produzir grandes quantidades de enzimas lignocelulolíticas, podendo alcançar uma produção de até 100 g/L em condições industriais (Gupta *et al.*, 2016). Portanto, esse fungo é atrativo e amplamente utilizado na produção de enzimas para aplicações nas indústrias de papel e celulose, alimentos, rações e têxteis e, atualmente, com importância crescente na biorrefinaria e em biocombustíveis (Häkkinen *et al.*, 2012). Desde que foi isolada, a linhagem QM6a foi submetida a mutagênese para obtenção de linhagens com maior produção de celulases, em destaque para as linhagens QM9414 e RutC30.

O sequenciamento do genoma de *T. reesei* permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e do sistema celulolítico desse fungo. Surpreendentemente, *T. reesei* possui o menor repertório de genes de celulases e hemicelulases entre os fungos que degradam a biomassa, mostrando que possui um dos sistemas mais inteligentes e eficientes de degradação da biomassa lignocelulósica (Martinez *et al.*, 2008). A reanotação do genoma do *T. reesei* identificou 201 genes de glicosil hidrolases, 22 carboidratos esterases e cinco genes de polissacarídeos liases. As celulases produzidas por *T. reesei* pertencem a seis famílias de GH: endoglicanases são encontradas nas famílias GH5, GH7, GH12 e GH45, as exoglucanases nas famílias GH6 e GH7 e as β -glicosidases nas famílias GH3 e GH1 (Häkkinen *et al.*, 2012).

A maquinaria celulolítica de *T. reesei* é constituída de duas exoglicanases ou celobiohidrolases (Cel7a/CBH I e Cel6a/CBH II), quatro caracterizadas endoglicanases (Cel7b/EG I, Cel5a/EG II, Cel12a/EG III e Cel45a/EG V) e três possíveis endoglicanases (*Tr77824*, *Tr53731* e Cel5b), cinco caracterizadas β -glicosidases (Cel3a/BGL I, Cel1a/BGL II, Cel1b, Cel3d e Cel3i/BGL3i) e outras seis possíveis β -glicosidases (Cel3b, Cel3c, Cel3e, Cel3f, Cel3h e BGL3j).

Além disso, o genoma de *T. reesei* codifica 16 hemicelulases. Entre elas, cinco xilanases: XYN1, XYN2 e XYN5, pertencentes à família GH11 e XYN3 e

XYN4, pertencentes às famílias GH10 e GH30, respectivamente. Outras hemicelulases caracterizadas em *T. reesei* incluem: β -xilosidases, α -arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil esterases, β -manosidases, β -mananases, β -galactosidases, feruloil esterase, xiloglucanase, entre outras (Häkkinen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Novy *et al.*, 2019; Zou *et al.*, 2018). A Figura 2 mostra as principais celulasas e hemicelulases de *T. reesei* envolvidas na desconstrução da holocelulose.

Figura 2. O complexo holocelulolítico de *T. reesei*. As CBHs Cel7a e Cel6a, as endoglicanases, LMPOs e a proteína *Swollenin* atuam de forma sinérgica para despolimerizar a celulose e as β -glicosidases hidrolisam a celobiose para produzir glicose. Diversas hemicelulases atuam na hidrólise do heteropolímero hemicelulose. Fonte: Adaptado de Paula *et al.*, 2018.

Cel7a é a principal e mais abundante enzima do complexo celulolítico de *T. reesei*, compreendendo aproximadamente 60% das proteínas totais secretadas pelo fungo, seguida por Cel6a e pela endoglicanase Cel7b, enquanto as β -glicosidases representam apenas 1% das proteínas secretadas (Paula, de *et al.*, 2018). Análises transcriptômicas mostraram que 61 genes que codificam CAZymes foram altamente expressos em celulose quando comparados a glicose. O principal gene regulado positivamente foi um de uma polissacarídeo mono-oxigenase dependente de cobre *cel61b* (ID 120961) (Santos Castro, Dos *et al.*, 2014). Anteriormente classificadas como endoglicanases, GHs da família

61 são LMPOs, atuando na degradação do material lignocelulósico por meio de um mecanismo oxidativo. Além de Cel61b, o genoma de *T. reesei* codifica cinco candidatos a membros da família GH61 (Häkkinen *et al.*, 2012; Langston *et al.*, 2011).

2.4. Regulação transcricional da expressão de holocelulases

Para sobreviver a diferentes ambientes, o fungo precisa sensoriar o ambiente e responder a ele de acordo. Após reconhecer a fonte de carbono disponível, o fungo ativa vias de sinalização que aumentam ou diminuem a transcrição de genes envolvidos na degradação e metabolização de cada fonte de carbono. Portanto, a produção de enzimas degradadoras da parede celular de plantas é finamente controlada e sua regulação transcricional é realizada por diversos fatores de transcrição. Celulose e outros oligossacarídeos derivados da biomassa lignocelulósica são ativadores da transcrição de genes que codificam enzimas celulolíticas. Em *T. reesei*, o indutor mais forte da expressão de celulases é a sofrorse, um dissacarídeo formado por meio de uma reação chamada de transglicosilação, constituído por dois resíduos de glicose unidos por ligação glicosídica β -1,2. Lactose é outro indutor da expressão de celulases em *T. reesei*, enquanto sacarídeos de fácil metabolização, como a glicose, atuam como repressores (Borin *et al.*, 2017; Kiesenhofer, Mach e Mach-Aigner, 2018; Mandels, Parrish e T., 1962; Nogueira *et al.*, 2018; Paula, de *et al.*, 2018).

Em *T. reesei*, o principal ativador da expressão de celulases e hemicelulases é o fator de transcrição Xyr1 (*Xylanase regulator 1*). Esse FT é do tipo dedo de zinco (ZF, *zinc finger*) e pertence à família Zn₂Cys₆, cujo domínio de ligação ao DNA contém seis resíduos de cisteína ligados a dois átomos de zinco (Castro *et al.*, 2014; MacPherson, Laroche e Turcotte, 2006) e possui um motivo de ligação ao DNA com a sequência consenso 5'-GGC(T/A)₃-3' (Furukawa *et al.*, 2009). Xyr1 foi primeiramente identificado como um ativador da expressão da xilanase XYN1 (Rauscher *et al.*, 2006) e posteriormente como um regulador positivo de outros genes além de *xyn1*: *xyn2*, *cel7a*, *cel6a*, *cel7b*. Além disso, a deleção desse regulador elimina a produção de celulases e xilanases, demonstrando que Xyr1 tem um papel crucial no controle da expressão tanto de enzimas xilanolíticas quanto celulolíticas, diferente de seus ortólogos em

Neurospora crassa e *Penicillium oxalicum* (Stricker *et al.*, 2006). Estudos recentes mostraram que Xyr1 requer o fator de transcrição Rxe1 (*Regulator of Xyr1 expression 1*) para sua transcrição (Wang, L., Lv, *et al.*, 2019).

Outro importante regulador positivo na expressão de celulases em *T. reesei* é o fator de transcrição Ace3 (*Activator of cellulase expression 3*). Sua superexpressão aumentou significativamente a produção de celulases e xilanases enquanto sua deleção praticamente aboliu a produção dessas enzimas (Häkkinen *et al.*, 2014). Recentemente, Zhang e colaboradores investigaram o papel de Ace3 na regulação da expressão de celulases. Esse fator de transcrição regula positivamente a produção de celulases e hemicelulases direta e indiretamente, se ligando aos promotores das celulases *cel7a* e *cel6a* e também de Xyr1 e Crt1 (*Cellulose responsive transporter 1*), um transceptor essencial envolvido na indução da produção de celulases. Além disso, Ace3 fisicamente interage com Xyr1 para formar heterodímero ou heteromultímeros para aumentar a expressão de celulases (Zhang, J. *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2013)

O fator de transcrição Ace2 (*Activator of cellulase expression 2*) é outro ativador da transcrição em *T. reesei*, cuja deleção reduz a expressão de genes que codificam as principais celobiohidrolases e endoglicanases, além de uma redução de 30-70% da atividade celulolítica (Aro *et al.*, 2001). O papel de Vib1 (*Vegetative incompatibility blocked 1*) na produção de celulases foi identificado primeiramente por análises genômicas na linhagem QM9978, cuja perda de *vib1* ocasionou a redução drástica na produção de celulases (Ivanova *et al.*, 2017). A superexpressão desse fator de transcrição aumentou a atividade celulolítica em condições indutoras e repressoras (Zhang, Zhao e Bai, 2018). O ortólogo de Vib1 em *N. crassa*, VIB-1, regula positivamente a expressão de celulases de forma indireta, através da repressão do fator de transcrição CRE-1, o principal repressor da expressão de celulases (Xiong, Sun e Glass, 2014). Em *T. reesei*, o papel de Vib1 na rede regulatória da expressão de celulases ainda não é claro. Outros reguladores positivos da produção de holocelulases em *T. reesei* descritos recentemente foram Clp1 (*CTI6-like protein 1*) e Are1 (Qian *et al.*, 2019; Wang, L., Yang, *et al.*, 2019).

O principal repressor da expressão de celulases é o fator de transcrição do tipo Cys₂His₂ Cre1 (*Carbon catabolite repressor 1*), responsável por mediar a repressão catabólica de carbono (CCR) em *T. reesei*. O mecanismo de

repressão catabólica é uma forma de controle do metabolismo no fungo. Na presença de fontes de carbono facilmente metabolizáveis, como a glicose, a expressão de genes necessários para utilizar outras fontes mais complexas é reprimida (Ilmén *et al.*, 1997). Cre1 reprime a expressão de diversas celulases e hemicelulases, além do próprio Xyr1 (Antoniêto *et al.*, 2014). O mecanismo de CCR ainda é um desafio na produção de celulases. Recentemente, Han e coautores mutaram diversos resíduos na região C-terminal de Cre1 para mimetizar a desfosforilação desse regulador, o que resultou no aumento da atividade celulolítica em meio contendo glicose e num alívio de CCR (Han *et al.*, 2020).

Além de Cre1, outro repressor de celulases é o Ace1 (*Activator of cellulase expression 1*), identificado em uma biblioteca de proteínas que se ligam ao promotor do gene *cel7a* (Saloheimo *et al.*, 2000). Mais tarde, mostrou-se que Ace1 é um repressor da expressão de celulases e xilanases, onde sua deleção causou um aumento da expressão das principais celulases e de duas xilanases, usando celulose e sofrose como fontes de carbono indutoras (Aro *et al.*, 2003). Outro repressor que regula diretamente o gene *cel7a* é o fator de transcrição Rce1 (*Repressor of cellulase expression 1*). A deleção desse repressor aumenta a atividade celulolítica porém não tem efeito na atividade de xilanase, indicando um efeito específico na regulação da expressão de celulases. Além disso, análises da interação proteína-DNA mostraram que Rce1 atua como um antagonista de Xyr1, competindo pelos mesmos sítios de ligação ao DNA no promotor de *cel7a* (Cao *et al.*, 2017). Rce1 é um alvo direto de um outro fator de transcrição identificado recentemente, denominado Ctf1. Ctf1 também atua como repressor dos genes celulolíticos, porém de forma indireta. Ele ativa a expressão de Rce1 enquanto reprime a expressão dos reguladores positivos Ace3 e Vib1 (Meng *et al.*, 2020).

A via de sinalização celular mediada por cálcio tem um importante papel na regulação da produção de holocelulases em *T. reesei*. De forma cooperativa com Ca^{2+} , o fator de transcrição Crz1 (*Calcineurin-responsive zinc finger 1*), regula a expressão dessas enzimas, ativando a transcrição de Xyr1 e também da celulase Cel7a (Chen *et al.*, 2016; Martins-Santana *et al.*, 2020).

Alguns fatores de transcrição são descritos como reguladores específicos para alguns genes de (hemi)celulases. BglR (*Beta-glucosidase regulator*) foi

descrito como um regulador positivo da expressão de β -glicosidases (Nitta *et al.*, 2012). Xpp1 (*Xylanase promoter-binding protein 1*) e SxIR (*Specific xylanase regulator*) são reguladores negativos da expressão de xilanases (Derntl *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

Em outros fungos filamentosos como *N. crassa*, *A. nidulans* e *P. oxalicum*, o principal regulador da expressão de celulasas é o fator de transcrição CLR-2/ClrB (*Cellulase degradation regulator 2*), cuja expressão é dependente da presença do fator de transcrição CLR-1 (*Cellulase degradation regulator 1*) em *N. crassa* (Coradetti *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Em *T. reesei*, seus homólogos apresentam um pequeno papel na regulação da produção de celulasas, possuindo maior relevância na regulação da expressão de xilanases de uma forma dependente de luz (Beier *et al.*, 2020).

Em eucariotos, a estrutura da cromatina exerce um papel importante na regulação da expressão gênica. A unidade básica que forma a cromatina é o nucleossoma, um complexo de DNA-proteínas em que octâmeros de histona envolvem a molécula de DNA. Estudos indicam que a localização do nucleossoma em genes de celulasas difere entre condições indutoras e não-indutoras, então fatores de transcrição tem que induzir o remodelamento local da cromatina para acessar seus elementos *cis*-regulatórios nos promotores dos genes-alvo (Ries *et al.*, 2014; Voss e Hager, 2014; Zeilinger *et al.*, 2003). O complexo HAP2/3/5 (*Heme-activated proteins*) é um fator de transcrição positivo que se liga ao motivo CCAAT na região promotora do gene *cel6a* (*cbh2*), afetando a localização do nucleossoma, ativando a transcrição (Zeilinger *et al.*, 2001). Além disso, os fatores de transcrição Xyr1 e Cre1 também estão envolvidos no remodelamento da cromatina (Mello-de-Sousa *et al.*, 2014, 2015; Mello-De-Sousa *et al.*, 2016).

Uma forma de alterar o enovelamento da cromatina é através de modificações de histona, como acetilação e metilação. A deleção de uma possível metil-transferase, Lae1, drasticamente reduziu a expressão de celulasas enquanto sua superexpressão aumentou significativamente a produção dessas enzimas. Lae1 e o fator de transcrição Xyr1 agem de forma interdependente para promover a expressão de celulasas. Até agora, não está claro como Lae1 regula a transcrição visto que não metila diretamente as histonas, porém pode estar envolvida em processos de acetilação e no arranjo

do nucleossoma (Karimi-Aghcheh *et al.*, 2013; Seiboth *et al.*, 2012). Lae1 junto com a proteína Vel1 formam o complexo VELVET, também essencial para expressão de holocelulases (Karimi Aghcheh *et al.*, 2014). Acetil-transferases de histonas também possuem um papel na transcrição de glicosil hidrolases (Häkkinen *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2013).

Devido ao importante papel que tem no controle da expressão dos genes celulolíticos, fatores de transcrição são alvos de engenharia genética na construção de linhagens que visam maior produção de celulases. A superexpressão de ativadores de transcrição e a deleção de repressoras é uma estratégia amplamente usada para aumentar a produção de celulases (Alazi e Ram, 2018). A construção de fatores de transcrição artificiais por fusão de domínios emergiu como uma estratégia promissora para aumentar a produção de celulases (Derntl, Mach e Mach-Aigner, 2019; Wang, F. *et al.*, 2019). A fusão do regulador Xyr1 ao domínio de ligação ao DNA de Cre1 causou uma produção constitutiva de celulases em *T. reesei* utilizando glicose como fonte de carbono (Zhang *et al.*, 2017). A engenharia de promotores através da manipulação de sítios de ligação de fatores de transcrição também é uma estratégia para aumentar a produção de celulases, especialmente reduzindo a inibição causada pela CCR (Sun *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2012).

2.5. O fator de transcrição Azf1

Recentemente, nosso grupo identificou e caracterizou um novo fator de transcrição que regula a expressão de celulases em *T. reesei*. A análise de genes diferencialmente expressos em dados de RNA-Seq permitiu a identificação de possíveis elementos *cis*-regulatórios e fatores de transcrição conhecidos de *Saccharomyces cerevisiae* a eles associados. Dentre os seis motivos de ligação ao DNA identificados, um motivo com semelhança ao sítio de ligação de Azf1 (*Asparagine-rich zinc finger 1*) destacou-se por estar enriquecido na região promotora de FTs *up*-regulados na presença de glicose e sofrorose em *T. reesei* e nas regiões promotoras de FTs e de genes que codificam CAZy em *A. nidulans*. Ou seja, os ortólogos de Azf1 podem ter um papel conservado na regulação de enzimas hidrolíticas expressas em ambos os organismos (Antonieto *et al.*, 2019).

Azf1 possui um domínio de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco. Proteínas que se ligam ao zinco formam uma das maiores famílias de reguladores transcricionais em eucariotos, exibindo estruturas secundárias variadas e uma enorme diversidade funcional, cujo papel não se restringe apenas a ligação a ácidos nucleicos, mas inclui a mediação de interações proteína-proteína, remodelação da cromatina e detecção de zinco, entre outras funções. Azf1 pertence à classe de ZF Cys₂His₂ (C₂H₂), que possuem um pequeno motivo proteico constituído de dois resíduos de histidina e dois de cisteína que se ligam ao íon zinco e apresentam a sequência consenso de aminoácidos Cys-X₂₋₄-Cys-X₁₂-His-X₃₋₅-His (X representa qualquer aminoácido). Esse íon é importante para estabilizar o domínio proteico e assim garantir a estrutura e função da proteína. Azf1 possui quatro domínios ZF C₂H₂ (Antonieto *et al.*, 2019; MacPherson, Larochelle e Turcotte, 2006).

O fator de transcrição Azf1 em *S. cerevisiae* (aqui denominado ScAzf1) foi inicialmente identificado como uma proteína supressora de uma mutação no gene da RNA polimerase mitocondrial RPO41 (Bröhl *et al.*, 1994). Posteriormente, Stein e coautores mostraram que ScAzf1 é uma proteína predominantemente nuclear e que sua síntese ocorre preferencialmente sob condições de crescimento não fermentáveis, sendo quase indetectável em glicose (Stein *et al.*, 1998). Curiosamente, Newcomb e coautores demonstraram que em glicose, ScAzf1 está envolvido na regulação do ciclo celular, ativando a transcrição da proteína CLN3, uma G1 ciclina, cuja expressão está diretamente relacionada à duração da fase G1 do ciclo celular (Newcomb, Hall e Heideman, 2002). Por fim, estudos realizados por Slattery e coautores mostraram que ScAzf1 possui uma função dependente da fonte de carbono: em glicose, ScAzf1 ativa genes do metabolismo de carbono e energético, enquanto que em glicerol-lactato, ativa genes necessários para a manutenção da parede celular (Slattery, Liko e Heideman, 2006).

A caracterização de Azf1 em *T. reesei* mostrou que houve uma mudança em seu papel na fisiologia do fungo em relação a ScAzf1. Enquanto ScAzf1 possui um papel importante quando a levedura cresce em presença de glicose, a expressão desse regulador em *T. reesei* é quase indetectável na presença desse açúcar. Além disso, Azf1 possui uma elevada expressão e atua como um regulador positivo na presença de derivados da parede celular de plantas, como

celulose e bagaço de cana. A caracterização funcional de Azf1 em *T. reesei* mostrou que, diferente de seu homólogo em *S. cerevisiae*, não regula o ciclo celular. A deleção de Azf1 em *T. reesei* afetou o crescimento do fungo em pH alcalino e a esporulação, com uma ligeira redução no tamanho dos esporos (Antonieto *et al.*, 2019).

Em relação aos genes relacionados à degradação da biomassa vegetal, análises transcriptômicas demonstraram que Azf1 regula positivamente diversas CAZymes e transportadores de açúcar. A deleção de *azf1* afetou a expressão de diversas celulasas e hemicelulasas em celulose e bagaço de cana e diminuiu significativamente as atividades de celobiohidrolase e β -glicosidase. Análises de Imunoprecipitação de Cromatina acoplada à PCR quantitativa (ChIP-qPCR) mostraram que, em presença de celulose, Azf1 se liga aos promotores dos genes das celulasas *cel7a* e *cel45a*, além da proteína acessória *swollenin*. Portanto, esses resultados mostram que Azf1 é um regulador positivo da expressão de celulasas, ativando diretamente sua transcrição (Antonieto *et al.*, 2019).

Objetivos

3. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é contribuir para a compreensão do papel do fator de transcrição Azf1 na regulação da expressão gênica de holocelulases no fungo *T. reesei* através da sua superexpressão. Dentre os objetivos específicos, pode-se citar:

- Construir um vetor para superexpressar o gene *azf1* e transformar o fungo *T. reesei*;
- Analisar a expressão gênica de *azf1* nos transformantes obtidos cultivados em glicose e celulose;
- Analisar o perfil de crescimento do mutante em diferentes fontes de carbono;
- Analisar a expressão gênica de holocelulases nas linhagens parental e mutante;
- Determinar a atividade holocelulolítica no cultivo em diferentes fontes de carbono.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Construção do vetor de expressão

Para superexpressão do fator de transcrição Azf1, foi construído um vetor onde o gene está sob controle do promotor constitutivo do gene *cdna1* (função não caracterizada), denominado *Pcdna1*, que já é utilizado em sistemas de expressão em *T. reesei* e não sofre inibição por glicose (Nakari-Setälä e Penttilä, 1995).

O vetor de expressão foi construído com base no plasmídeo pLMcdna (Uzbas *et al.*, 2012), que contém a região promotora de *cdna1* e o cassete de expressão de higromicina B-fosfotransferase (*hph*) como marcador de seleção (Figura 3). Primeiramente, o vetor pLMcdna foi digerido, separadamente, com as enzimas de restrição *SalI* e *SbfI* para confirmar os sítios para posterior clonagem. A digestão do plasmídeo foi realizada conforme instruções do fabricante FastDigest (ThermoFisher Scientific): 1 µL de DNA plasmidial (1 µg de DNA), 1 µL de Tampão Fast Digest 10X, 1 µL de enzima FastDigest, 7 µL de água DEPC. As reações foram incubadas por 1h a 37°C.

Após a confirmação dos sítios para clonagem, a sequência do transcrito do gene *azf1* (Tr103275) e mais 319pb de sua região terminadora foi obtida a partir do genoma de *T. reesei*, disponível no JGI Genome Portal (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>), localizado em scaffold_1:3261595-3263293. e sintetizada pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). O gene sintetizado foi digerido com as enzimas de restrição *SalI* e *SbfI* e clonado, pela mesma empresa, no vetor pLMcdna.

O plasmídeo resultante foi denominado pPcdna1-azf1 e, além de ser confirmado por sequenciamento, foram realizadas reações de digestão enzimática para confirmar se o promotor *Pcdna1* (digestão com as enzimas *XhoI* e *SalI*) e o gene *azf1* (digestão com as enzimas *SalI* e *SbfI*) estavam clonados corretamente. Todas as reações estão listadas na Tabela abaixo e foram realizadas incubando-se o sistema a 37°C *overnight* (16h-18h). Também foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *azf1* utilizando os *primers* Azf1Salfw (5'-GTCGACATGGCCCTCGCAGCTCAA-3') e

Azf1Sbfrv (5'-CCTGCAGGGATGCGTCGAGTTCGCCTTGAAGTC-3'), os sítios de restrição estão sublinhados. A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima Taq High Fidelity Polymerase e os ciclos consistiam em: desnaturação inicial: 94°C/3 minutos, uma vez; ciclo 1 (40 vezes): 94°C/30 segundos, 65°C/1 minuto, 72°C/2 minutos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez.

Figura 3. Mapa do plasmídeo pLMcdna.

Tabela 1. Reações de digestão enzimática para confirmação do plasmídeo pPcdna1-azf1

Reagentes		Volume	
DNA plasmidial	1 µL (~600 ng)	1 µL (~600 ng)	1 µL (~600 ng)
Tampão FastDigest 10x	1 µL	1 µL	---
Tampão Tango 10x	---	---	2 µL
Água	7 µL	7 µL	5 µL
Enzima(s)	1 µL <i>XhoI</i>	0,5 µL <i>XhoI</i> 0,5 µL <i>SalI</i>	0,5 µL <i>SalI</i> 1,5 µL <i>SbfI</i>

4.2. Propagação do vetor pPcdna1-azf1 utilizando *Escherichia coli* DH5α

4.2.1. Obtenção de células competentes de *E. coli* DH5α

A bactéria *E. coli* DH5α foi plaqueada em meio LB-ágar e crescida *overnight* a 37°C. Para o pré-inóculo, uma colônia isolada foi transferida da placa para 5 mL de meio LB sem antibiótico e incubada *overnight* a 37°C e 200 rpm. O volume de 1 mL do pré-inóculo foi adicionado em 100 mL de meio LB e incubado a 37°C e 200 rpm. Após a OD₆₀₀ atingir um valor entre 0,4 e 0,6, o meio contendo as células foi dividido em *falcons* de 50 mL e incubado no gelo por 15 min. Em seguida, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de solução de CaCl₂ 100 mM gelada, com suave agitação, e incubado no gelo por 20 min. As células novamente foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4°C e todo o *pellet* obtido foi ressuscitado em 1 mL de solução CaCl₂ 100 mM e glicerol 10%. As células foram aliquoteadas e congeladas utilizando N₂ líquido.

4.2.2. Transformação de *E. coli* DH5α com o plasmídeo pPcdna1-azf1

Para a transformação, uma alíquota contendo 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α foi incubada com 80 ng do plasmídeo pPcdna1-azf1 por 30 min. Posteriormente, foi realizado o choque térmico incubando o sistema de transformação a 42°C por 2 min. Após isso, o sistema foi imediatamente resfriado utilizando-se gelo e em seguida foi adicionado 300 µL de meio LB e incubado por 30 min a 37°C. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubada *overnight* a 37°C para seleção de colônias positivas.

4.2.3. Extração de DNA plasmidial em média escala (Midiprep)

Primeiramente, uma colônia isolada foi transferida para o pré-inóculo de 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubada *overnight* a 37°C e 200rpm. Após isso, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado ao inóculo contendo 100

mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL), que novamente foi incubado *overnight* a 37°C e 200 rpm.

O inóculo foi centrifugado e o *pellet* contendo as células foi ressuspensionado em 2,5 mL de solução P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8 e EDTA 10 mM pH 8), agitado com auxílio de vórtex e incubado 5 min no gelo. Em seguida, foi adicionado 3,3 mL de solução P2 (NaOH 200 mM e SDS 1%), homogeneizado lentamente e incubado 5 min no gelo. Para precipitação, foi adicionado 3,3 mL de solução P3 (Acetato de potássio 3 M pH 5,5), homogeneizado lentamente e incubado em gelo por 30 min.

Após isso, centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e foi adicionado 5,5 mL de solução de PEG (20% PEG 8000 e NaCl 2,5M) e incubado por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. Após a cuidadosa remoção do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de água DEPC e tratado com 1,5 µL de RNase (20 mg/mL) por 45min a 37°C.

Após o tratamento, foram adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e a reação fenol:clorofórmio foi realizada uma segunda vez. Após a coleta do sobrenadante, este foi lavado com a adição de 400 µL de clorofórmio. Após centrifugação a 12.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi coletado e foi adicionado 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M pH 5 e 2,5x o volume de etanol 100% e incubado *overnight* a -20°C.

Após a precipitação do material genético, centrifugou-se por 30 min a 14.000 rpm seguida de remoção do sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado em 300 µL de etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e após secagem com auxílio de *SpeedVacuum*, o *pellet* contendo o plasmídeo foi ressuspensionado em 200 µL de água DEPC.

4.3. Transformação das linhagens de *T. reesei* QM6a e QM9414

A transformação de *T. reesei* com o plasmídeo pPcdna1-azf1 foi realizada para as linhagens QM6a e QM9414, conforme metodologia descrita por Gruber e colaboradores, com algumas modificações (Gruber *et al.*, 1990).

4.3.1. Obtenção dos protoplastos

As linhagens QM6a e QM9414 foram crescidas em meio MEX (3% extrato de malte; 2% ágar) por 7 dias até completa esporulação. Para obtenção dos protoplastos, uma solução desses esporos frescos foi inoculada sobre discos de papel celofane contidos em 5 placas de meio MEX e peptona 0,1% e incubados *overnight* a 30°C para germinação. Para lise da parede celular, a enzima de lise de *Trichoderma harzianum* (Sigma #L-1412; apresenta atividade de β -glicanase, celulase, protease e chitinase) foi diluída em Tampão P ((NH₄)₂SO₄ 0,6 M; KH₂PO₄ 0,15 M; K₂HPO₄ 8 mM pH 5,6) numa concentração de 5 mg/mL e, em seguida, esterilizada por filtração (Millipore, 0,22 μ m).

Após o período de germinação, os discos de celofane contendo o micélio foram colocados no interior de placas Petri (90 mm) estéreis contendo 15 mL da solução de lise para digestão completa dos micélios. Em seguida, a placa contendo a solução de lise com os micélios foi incubada por 5h a 30°C e 60 rpm.

Posteriormente, a solução contendo o micélio digerido foi coletada da placa com o auxílio de ponteira *cut tips*, filtrada em funil contendo Miracloth e centrifugada por 10 min a 4000 g 4°C. Os protoplastos presentes no *pellet* foram lavados com 10 mL de Tampão P seguido por centrifugação por 10 min a 4000 g 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e, por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de Tampão STC (CaCl₂.2H₂O 10 mM; Sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 1 M pH 7,4) e foram adicionados 250 μ L da solução de PEG (CaCl₂.2H₂O 50 mM; PEG 6000 25%; Tris HCl 1M pH 7,5).

4.3.2. Transformação do fungo

Para a transformação, 130 μ L da suspensão de protoplastos foram incubados com 10 μ L (30 μ g) do plasmídeo pPcdna1-azf1 por 30 min em gelo. Após esse período, foi adicionado 1 mL da solução de PEG e a mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de Tampão STC. À essa mistura, foi adicionado meio Overlay (extrato de malte 3%; ágar 2%; Sorbitol 1,2 M) até completar 40 mL. Após homogeneização, 10 mL da mistura foi adicionado à cada placa de transformação e as placas resultantes foram incubadas por 1h a 30°C. Em seguida, foram adicionados à

cada placa 10 mL de meio seletivo (extrato de malte 3%; ágar 2%; Sorbitol 1,2 M; higromicina 50 µg/mL) e as placas foram incubadas a 30°C até colônias ficarem visíveis.

4.3.3. Seleção dos transformantes positivos

Aproximadamente 36h após a transformação, cada transformante (6 por placa de transformação) foi retirado da placa e transferido para pequenas placas contendo meio MEX com higromicina (50 µg/mL) e incubados a 30°C por 5 dias até a esporulação. Após esse período, os transformantes foram submetidos a três *rounds* de seleção de conídios, espalhando-se uma gota de solução de esporos em placas de meio MEX com higromicina contendo 0,1% de Triton-X como restritor de colônia, como esquematizado na Figura 4.

Para avaliar a estabilidade dos transformantes, eles foram transferidos para placas de meio não-seletivo (MEX sem higromicina) e, após a esporulação, eles foram novamente transferidos para placas com higromicina até esse processo completar três ciclos (Figura 4). Ao final dos três *rounds*, os transformantes resultantes foram ressuspensos em uma solução de esporos (NaCl 0,8% (p/v); Tween 80 0,05% (v/v)) com glicerol 50% e estocados a -80°C.

Figura 4. Representação esquemática das etapas de transformação do fungo e seleção dos transformantes.

4.3.4. Extração do DNA genômico

Para extração do DNA genômico, 10 µL da solução de esporos do estoque de cada transformante foi inoculado em placas de MEX com higromicina. Após a esporulação, eles foram transferidos para placas de MEX sem higromicina. Após o crescimento, foi obtida uma solução de esporos para cada fungo e esta foi inoculada em 50 mL de meio MEX em Erlenmeyers de 125 mL por 72h a 30°C e 200 rpm. O micélio foi filtrado utilizando a malha Miracloth, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

O processo de extração teve início com a maceração dos micélios com auxílio de nitrogênio líquido. A massa micelial macerada foi adicionada a tubos contendo 800 µL de Tampão de Extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; EDTA 5 mM) com 16 µL de β-mercaptoetanol. A mistura foi agitada em vórtex e incubada a 65°C por 20 min em banho-maria. Após esse período, foram adicionados às amostras 400 µL de fenol e 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1). As amostras foram novamente agitadas em vórtex e centrifugadas a 20.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1), agitado em vórtex e centrifugado a 20.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 800 µL de isopropanol e incubado por 30 min a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 20.000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e após secagem com auxílio de *SpeedVacuum*, o *pellet* contendo o DNA foi ressuscitado em 100 µL de água DEPC. Por fim, foram adicionados 5 µL de RNase (20mg/mL) e a mistura foi incubada por 15 min a 37°C e então a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.3.5. Confirmação da integração do plasmídeo pPcdna1-azf1

O plasmídeo pPcdna1-azf1 possui replicação epissomal, não integrando ao genoma por meio de recombinação homóloga. Para confirmar sua integração ao genoma de *T. reesei*, foram realizadas duas PCRs. A primeira foi para verificar a presença ou ausência do marcador de seleção *hph*. Os *primers*

usados na segunda PCR anelam em uma região que abrange parte do promotor *Pcdna1* e parte do gene *azf1*. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Primers utilizados para confirmação dos transformantes

Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
ScCdnaAzfFw	CCCGACTTTGACATCATGAGGG	1103
ScCdnaAzfRv	CCGCTTTGTGTACGAAGTACG	
ScreeningHphF	CTGAACTCACCGCGACGTC	857
ScreeningHphR	GCCCAAGCTGCATCATC	

As reações foram realizadas com a enzima TaKara Taq DNA Polymerase e os ciclos consistiam em: desnaturação inicial: 98°C/30 segundos, uma vez; ciclo 1 (40 vezes): 98°C/10 segundos, 65°C/30 segundos, 72°C/1 minuto e 30 segundos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez. Como controle positivo da reação foi utilizado o plasmídeo pPcdna1-azf1 e como controle negativo foi utilizado o DNA da linhagem parental, além de uma reação sem DNA (branco).

4.4. Análise do crescimento em diferentes fontes de carbono

Para a caracterização fenotípica, inicialmente foi analisado se a superexpressão do gene *azf1* afeta o crescimento e a formação de biomassa. Para isso, 10⁶ esporos/mL das linhagens parental e mutante oriundos de placas recém-esporuladas foram inoculados em 50 mL Meio Mandels-Andreotti (MA) (50% solução mineral (2,8 g/L (NH₄)₂SO₄, 4 g/L KH₂PO₄, 0,6 g/L MgSO₄.7H₂O e 0,8 g/L CaCl₂.2H₂O), 48% tampão citrato-fosfato 0,1M e 2% solução de elementos de traços 50X (250 mg/L FeSO₄.7H₂O, 85 mg/L MnSO₄.H₂O, 70 mg/L ZnSO₄.7H₂O e 100 mg/L CoCl₂.2H₂O, pH 2), peptona 1 g/L e ureia 0,3 g/L) com 1% glicerol (v/v) e cultivado a 30°C e 200 rpm por 24h. Após esse período, o micélio foi filtrado à vácuo e seco em estufa a 70°C por 6h. Em seguida, seu peso foi determinado. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra.

Para avaliar o perfil de crescimento em diferentes fontes de carbono, 10⁶ esporos/mL das linhagens parental e mutante foram inoculados em placas de

deep wells contendo 5 mL de Meio Mandels-Andreotti com 1% (p/v) de cada fonte de carbono (glicose, xilose, arabinose, maltose, lactose). As placas foram incubadas por 24h a 30°C e 200 rpm. Em seguida, os micélios foram coletados e o peso seco foi mensurado conforme mencionado acima.

4.5. Cultivo em glicose e celulose

As linhagens parental e mutante foram cultivadas em glicose (fonte repressora da produção de celulasas) e celulose (fonte indutora da produção de celulasas). Para o crescimento em celulose, 10^6 esporos/mL das linhagens parental e mutante foram inoculados inicialmente em 100 mL de meio Mandels-Andreotti com glicerol 1% (v/v) e cultivados a 30°C e 200 rpm por 24h. Em seguida, o micélio foi coletado e lavado com meio Mandels-Andreotti sem fonte de carbono e então a mesma massa de ambas as linhagens foi transferida para 100 mL de meio Mandels-Andreotti com celulose 1% (p/v) e cultivado por 8 e 24h nas mesmas condições. Para o crescimento em glicose, 10^6 esporos/mL das linhagens parental e mutante foram inoculados em 100 mL de meio Mandels-Andreotti com glicose 1% (p/v) e cultivado nas mesmas condições. Também foi realizado o cultivo onde 10^6 esporos/mL das linhagens parental e mutante foram inoculados diretamente em celulose e crescidos por 24 e 48h. Após o tempo de cultivo, os micélios foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e o sobrenadante armazenado em -20°C. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra.

4.6. Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Os micélios coletados foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRI® (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a síntese do cDNA, 1µg de RNA foi primeiramente tratado com DNase I (ThermoFisher Scientific) para remoção de DNA genômico. Após essa etapa, fitas de cDNAs foram sintetizadas usando-se o kit Maxima™ First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific) de acordo com instrução do fabricante. Cada cDNA foi diluído 1:50 e os mesmos

foram utilizados para análise por PCR em Tempo Real (qRT-PCR) no equipamento Bio-Rad CFX96™, usando SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) para o sinal de detecção, de acordo com as instruções do fabricante. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade total de cDNA presente em cada reação. Os primers utilizados para amplificação dos genes analisados estão listados na Tabela.

Tabela 3. Primers utilizados na análise da expressão gênica por qRT-PCR

Gene	Sequência <i>Foward</i> (5'-3')	Sequência <i>Reverse</i> (5'-3')
<i>azf1</i>	AGAATCTCACCATACGCCATG	CAATGCCCATGTGAAAGACG
<i>cel7a</i>	CCGAGCTTGGTAGTTACTCTG	GGTAGCCTTCTTGACTGAGT
<i>cel6a</i>	ACAAGAATGCATCGTCTCCG	TGTTCCACCCGTTGTAGTTG
<i>swa</i>	GAGTGAATGTCTTGATGG	CCAAACTATACGAGTAGCC
<i>cel45a</i>	CAGCGACGTCTACATTGG	TGGTCCAGAATGCACTCG
<i>xyn1</i>	GGCCAAATTATCGTCAACTGTC	TCTGTCTTTTGGGCTTGGAG
<i>cel7b</i>	CCCTCAACACTAGCCACCAG	AGGTCTTGGAGGTGTCAACG
<i>cel3d</i>	AACCCAGCATATCTCAACTACG	CTTGAAGGTAGCGTAAGACAGG
<i>cel61b</i>	ACTATGTCTTCCGCCATGAAC	CACGCACTGAGGATAGTTCTG
<i>Tr56684</i>	CACAACCCTCTCTATGCTGAT	GGGCACGATATTTGGGATATG
<i>xyr1</i>	CAATCCTCTCCGTCGCTATTC	CTGTTGCCGAATGTGTTGAC
<i>cre1</i>	CTCCTACTCGTCCTTTGTCATG	GCAAGCATCGTAATGTGCTTG
<i>cel1a</i>	TTTGCCTGGTCGCTCATG	AATCAGCTCGTCAAACAGCG
<i>cel3b</i>	CCAGGATAACTTCAACGA GGG	ATGTGGAGGTTGGAGAACTTG
<i>cel1b</i>	CCATCTACATCACCGAGAACG	TCCAAGTGCGAGTCAAAGTAG
<i>Tr4921</i>	GTATTCTGGATATTACCGGCCTC	GTTGTGTTGAGACTTGAAGGC
<i>Tr111466</i>	AGAGAATAGAGACCCCTTACCG	AGAAAAGAGGATAAGCCGAGTG
<i>Tr58456</i>	CAATGTCCTCTACTTCCTCAGC	ATCACAAGAGTATGCCAGTATAGC
<i>Tr108775</i>	CAACAGCAATGACAGCATCG	AAGTGAAAGCATCGGAGGTC
<i>actina</i>	TGAGAGCGGTGGTATCCACG	GGTACCACCAGACATGACAATGTT

4.7. Atividade enzimática

As atividades enzimáticas de endo-1,4- β -glicanase (CMCase) e xilanase foram avaliadas através do método do açúcar redutor, quantificados por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). As atividades enzimáticas de celobiohidrolase, β -glicosidase e β -xilosidase foram avaliadas utilizando os substratos sintéticos *p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside (pNPC), *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)

e *p*-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside (pNPXyl) (Sigma®), respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como aquela que libera 1 μ mol do açúcar redutor correspondente (endoglicanases e xilanases) ou hidrolisa 1 μ mol de substrato (celobiohidrolase, β -glicosidases e β -xilosidases) por minuto, nas condições do experimento. Todos os ensaios de atividade foram realizados em triplicata (biológica e experimental).

4.7.1. Atividade de endo-1,4- β -glicanase (CMCase)

A atividade de endo-1,4- β -glicanase foi determinada utilizando-se o substrato carboximetilcelulose (CMC) solubilizado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, atingindo-se uma concentração final de 1%. As reações foram realizadas utilizando-se 30 μ L do sobrenadante da amostra com 30 μ L do substrato 1%. Esta mistura de reação foi incubada a 50°C durante 30 min. Posteriormente, foram adicionados às amostras 60 μ L de DNS e incubadas por 5 min a 95 °C. Então, 100 μ L de cada reação foram transferidos para placa de leitura e lidos numa absorbância de 540 nm.

4.7.2. Atividade de endo-1,4- β -xilanase

A atividade de endo- β -1,4-xilanase foi determinada utilizando-se o substrato xilana 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5. Para as reações foram utilizados 25 μ L do sobrenadante da amostra com 50 μ L do substrato. Esta mistura de reação foi incubada a 50°C durante 30 min. Posteriormente, foram adicionados às amostras 75 μ L de DNS e incubadas por 5 min a 95 °C. Então, 100 μ L de cada reação foram transferidos para placa de leitura e lidos numa absorbância de 540 nm.

4.7.3. Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando-se o substrato pNPG 5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5. As reações foram realizadas utilizando-se 10 μ L do sobrenadante da amostra com 40 μ L do substrato e 50 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5. Esta mistura de

reação foi incubada a 50°C durante 15 min. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de carbonato de sódio 1M às amostras. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm com 100 µL de cada reação.

4.7.4. Atividade de β -xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi determinada utilizando-se o substrato pNPX 5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. As reações foram realizadas utilizando-se 10 µL do sobrenadante da amostra com 40 µL do substrato e 50 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. Esta mistura de reação foi incubada a 50°C durante 15 min. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de carbonato de sódio 1 M às amostras. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm com 100 µL de cada reação.

4.7.5. Atividade de celobiohidrolase

A atividade de celobiohidrolase foi determinada utilizando-se o substrato pNPC 5 mM em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5. As reações foram realizadas utilizando-se 10 µL do sobrenadante da amostra com 40 µL do substrato e 50 µL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5. Esta mistura de reação foi incubada a 50°C durante 3,5h. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de carbonato de sódio 1 M às amostras. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm com 100 µL de cada reação.

4.8. Dosagem de proteínas e Eletroforese (SDS-Page)

O sobrenadante obtido após o cultivo em celulose por 24h foi utilizado para analisar o perfil das proteínas secretadas pelas linhagens parental e mutante. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA – *Bovine Serum Albumin*) como padrão.

Para visualização do secretoma, 2 mL de cada replicata foi precipitado utilizando uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% em acetona e incubado *overnight* a -20°C. As amostras precipitadas foram então centrifugadas

a 12.000 rpm por 10 min e 4°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado três vezes com 500 µL de 0,07% de β-mercaptoetanol em acetona, a uma centrifugação de 12.000 rpm por 10 min e 4°C, e o *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de H₂O MilliQ. Por fim, a 30 µL de cada amostra foram adicionados 6 µL de tampão de amostra 5X e o sistema foi incubado a 95°C por 5min. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%. Após a corrida, o gel foi submetido a imersão em corante Coomassie Brilliant Blue Coloidal R-250 em temperatura ambiente sob agitação por 30 min, e em seguida lavados com água destilada e descorados com 10% (v/v) de ácido acético até aparecimento das bandas.

4.9. Extração de proteínas intracelulares

Para extração das proteínas intracelulares foram utilizados os micélios das linhagens parental e mutante após cultivo em meio Mandels-Andreotti com celulose 1% (p/v) por 24h, pré-crescido em glicerol. Primeiramente, eles foram triturados com o uso de nitrogênio líquido e 100 mg de massa micelial foram transferidos para 900 µL de tampão de extração PBS pH 7,4 (0,8% de NaCl; 0,02% KCl; 0,27% de Na₂HPO₄·7H₂O; 0,024% de KH₂PO₄; 10 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; e 0,2% de Cocktail inibidor de protease (Sigma)). Os micélios foram sonicados em amplitude 60% e pulso 10 *on* / 10 *off*, por 1 minuto, em gelo, a fim de que houvesse o rompimento da parede celular fúngica. Em seguida, foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado.

4.10. Western Blot

Os micélios das linhagens parental e mutante crescidos em glicose 1% (p/v) por 24h foram utilizados para extração das proteínas intracelulares conforme descrito acima. Para cada amostra, 30 µg de proteínas foram submetidos ao SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese, o gel foi mergulhado em Tampão de Transferência em Sistema Semi-Seco (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% Metanol, 0,0375% SDS) por 30 min a 4°C. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (GE Healthcare) com auxílio do sistema de transferência Trans-Blot®Turbo™ (Bio-Rad) a 25V e 0,6A

por 40 min. Posteriormente, a membrana foi corada com Ponceau Red 5% por 5 min para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3x por 5 min com TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1M NaCl e 0,05% Tween 20) e bloqueada com BSA 5% em TBST por 1h em temperatura ambiente. Então, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-Azf1 (Rheabiotech, Brasil) diluído (1:1.000) em TBST com BSA 5%. Após esse período, a membrana foi lavada 3x por 5min e incubada com o anticorpo secundário anti-*mouse* (1:3.000 em TBST) por 1h a temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi lavada 3x por 5min e o sinal foi detectado utilizando ECL Prime (GE Healthcare).

Para normalizar os níveis de proteína, a mesma membrana foi incubada por 45 min em Tampão de *Stripping* (100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl) para remover os anticorpos remanescentes. Em seguida, ela foi lavada 3x por 5 min com TBST e bloqueada com leite em pó desnatado 5% em TBST por 1h em temperatura ambiente. A membrana, então, foi incubada por 2h em temperatura ambiente com o anticorpo anti-actina diluído 1:20.000 na solução de bloqueio. Em seguida, a membrana foi lavada 3x por 5min com TBST e incubada com o anticorpo secundário anti-*mouse* (1:5.000 em TBST) por 1h a temperatura ambiente e o sinal foi detectado conforme descrito anteriormente. A análise densiométrica e a quantificação das bandas foram realizadas com o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

4.11. Produção de celulasas em presença de celulose e bagaço-de-cana

As linhagens parental e mutante foram crescidas em meio Mandels-Andreotti com glicerol 1% (v/v) por 24h a 200 rpm e 30°C. Em seguida, os micélios foram lavados com Mandels-Andreotti sem fonte de carbono e transferidos para o mesmo meio contendo 1% (p/v) de celulose ou bagaço-de-cana e cultivados por 96h nas mesmas condições. A cada 24h, alíquotas de 2 mL eram coletadas e centrifugadas a 10000 g por 15 min. O sobrenadante então era coletado para dosagem de atividade enzimática conforme descrito no item 4.7. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra.

4.12. Análise das redes regulatórias mediadas por Azf1

Para compreender as possíveis redes regulatórias da expressão de celulases mediadas por Azf1, buscou-se identificar outros fatores de transcrição que fossem diretamente regulados por Azf1 e possivelmente envolvidos na regulação da expressão de celulases.

Utilizando dados de RNA-Seq obtidos com as linhagens TU6 (parental) e $\Delta azf1$ cultivadas em bagaço de cana e glicerol, nós buscamos os genes de fatores de transcrição diferencialmente expressos. Os genes que apresentaram p -valor $\leq 0,05$ e a diferença entre os *fold change* Bagaço de cana/Glicerol (em $\log_2$) das linhagens parental e mutante maior que 1 ou menor que -1 foram considerados diferencialmente expressos. Além disso, uma segunda análise foi feita, onde os genes que apresentaram *fold change* $\Delta azf1$ /TU6 (em $\log_2$) maior que 1 ou menor que -1 também foram considerados diferencialmente expressos. Os fatores de transcrição identificados estão listados na Tabela 4. Em seguida, buscou-se nas suas regiões promotoras possíveis sítios de ligação para o Azf1.

Tabela 4. Fatores de transcrição diferencialmente expressos no RNA-Seq. FC: $\log_2$ *Fold change*. BC: bagaço-de-cana. G: glicerol. DE: diferença entre FC TU6 e FC $\Delta azf1$.

ID	Descrição	FC TU6 (BC/G)	FC $\Delta azf1$ (BC/G)	DE
122448	C2H2 transcription factor	1,846302326	0,653485176	1,19281715
4921	C2H2 transcriptional regulator	1,41039561	0,355420805	1,054974805
108775	transcription factor AbaA	1,850519158	3,005474359	-1,15495520
58456	Zn2Cys6 transcriptional regulator	0,854156382	2,153289836	-1,29913345
112539	Zn2Cys6 transcriptional regulator	3,3283038	4,645091627	-1,31678782
106677	Zn2Cys6 transcriptional regulator	-0,846807122	0,470111248	-1,31691837
54007	transcriptional regulator HMGtype	2,938849044	5,478157963	-2,53930891
FC ($\Delta azf1$/TU6)				
111466	Zn2Cys6 transcriptional regulator		2,471271	

Inicialmente, foi obtida a matriz de peso e posição (PWM – *Position weight matrix*) que representa o motivo de ligação de DNA, contendo a sequência consenso de bases de nucleotídeos onde o Azf1 se liga. Para isso, foi utilizada

a ferramenta online <http://zf.princeton.edu/index.php> (Persikov e Singh, 2014) através do método *Expanded linear SVM*, que emprega cálculos empíricos de interação de aminoácidos e nucleotídeos emparelhados e prevê PWMs que representam a especificidade da ligação fator de transcrição-DNA, para FTs do tipo dedo de zinco C₂H₂. O motivo de ligação foi confirmado por ChIP-qPCR (Antonieto *et al.*, 2019).

Após obtida a matriz, foi realizada a busca nos promotores dos fatores de transcrição para identificar quais eram diretamente regulados por Azf1, utilizando a ferramenta FIMO (Grant, Bailey e Noble, 2011), disponível no servidor *online* MEME (Bailey *et al.*, 2009). A sequência de promotores, compreendendo 1kb da região *upstream* ao ATG de cada gene, foi obtida do genoma de *T. reesei* através de um *script ad hoc*. Foi realizada uma PCR em tempo real para verificar se a superexpressão de Azf1 tinha efeito na expressão dos seus fatores de transcrição alvos.

Sabendo quais fatores de transcrição apresentaram possíveis sítios de ligação para Azf1, buscou-se gerar a PWM para cada um. Como o gene *Tr4921* codifica um fator de transcrição do tipo dedo de zinco C₂H₂, a matriz foi gerada conforme mencionado acima para Azf1. Os demais, que não possuem o domínio C₂H₂, foi utilizada uma outra estratégia. A partir da sequência de aminoácidos, foi realizado um BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para identificar ortólogos no genoma de *S. cerevisiae*. A PWM para cada ortólogo identificado em *S. cerevisiae* foi obtida no banco de dados YeTFaSCo (*The Yeast Transcription Factor Specificity Compendium*) (Boer, De e Hughes, 2012).

Utilizando as PWM obtidas para os FTs regulados por Azf1, buscou-se os possíveis motivos de ligação na sequência de promotores dos genes analisados na PCR em tempo real conforme descrito anteriormente.

4.13. Análises estatísticas

Os testes de significância estatística foram realizados utilizando *one-way* ANOVA seguida do teste de Bonferroni (comparação de todos os pares de colunas) no software GraphPad Prism versão 6. A significância é indicada na forma de valores de probabilidade. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Construção do vetor pPcdna1-azf1

A fim de superexpressar o fator de transcrição Azf1 em *T. reesei*, o transcrito *azf1* foi submetido ao controle do promotor constitutivo *Pcdna1*, utilizando como base o plasmídeo pLMcdna (Figura 3) (Uzbas *et al.*, 2012). Primeiramente, o vetor pLMcdna foi digerido com as enzimas *SalI* e *SbfI* para confirmar os sítios para posterior clonagem. Como mostrado na Figura 5, a digestão individual com as enzimas produziu uma única banda, de aproximadamente 6kb (tamanho esperado do plasmídeo), confirmando a presença de um único sítio de restrição para cada enzima. Então, nós prosseguimos com a clonagem do gene *azf1*.

Figura 5. Digestão do plasmídeo pLMcdna. 1: Digestão com a enzima *SalI*. 2: Digestão com a enzima *SbfI*. M: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)

Para clonagem de *azf1* no vetor, a sequência do transcrito e parte da sua região terminadora foi obtida a partir do genoma de *T. reesei*, sintetizada e clonada entre os sítios de *SalI* e *SbfI* pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). O vetor resultante, denominado pPcdna1-azf1 (Figura 6A),

foi submetido a diversas reações de digestão enzimática para confirmar se as clonagens estavam corretas.

Após a inserção do gene *azf1*, espera-se um plasmídeo com o tamanho de aproximadamente 8kb, como observado na Figura 6B, colunas 1 e 2. Quando o plasmídeo foi digerido com as enzimas *XhoI* e *SalI*, observa-se duas bandas: uma em torno de 7kb e outra 1kb, correspondente ao promotor *Pcdna1* (Figura 6B, coluna 3). Após a digestão com as enzimas *SalI* e *SbfI*, observa-se novamente duas bandas: uma em torno de 6kb e outra em torno de 2kb, correspondente a ORF de *azf1* e sua região terminadora (Figura 6B, coluna 4). Por fim, a presença do gene *azf1* também foi confirmada através de PCR, onde pode ser observado um amplicon de aproximadamente 2kb (Figura 6B, coluna 5).

Figura 6. Plasmídeo pPcdna1-azf1. (A) Representação esquemática do cassete de expressão pPcdna1-azf1. Azf1 foi inserido entre os sítios de *SalI* e *SbfI*. *Pcdna1*, promotor do gene *cdna1*; *HygR*, gene da higromicina β transferase; *AmpR*, gene β lactamase. (B) Perfil de digestão enzimática de pPcdna1-azf1: 1) Plasmídeo fechado; 2) Plasmídeo linearizado após digestão com *SalI*; 3) Plasmídeo digerido com *XhoI* e *SalI*; 4) Plasmídeo digerido com *SalI* e *SbfI*; 5) Amplificação do gene *azf1* por PCR. M: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)

Esses resultados confirmam a autenticidade do vetor pPcdna1-azf1. Para obter uma grande quantidade de plasmídeo, ele foi inserido na bactéria *E. coli* DH5α e o cultivo foi realizado em média escala. Após extração do plasmídeo, ele foi utilizado para transformar o fungo *T. reesei*.

5.2. O vetor pPcdna1-azf1 foi integrado com sucesso ao genoma de *T. reesei*

O vetor pPcdna1-azf1 foi utilizado para transformar as linhagens de *T. reesei* QM6a e QM9414. Foram utilizados 30 µg de plasmídeo para transformar os protoplastos e, após sucessivas etapas de seleção em meios de cultivo contendo o marcador de seleção higromicina (50 µg/mL), foram obtidos sete transformantes oriundos da linhagem QM6a e dois transformantes oriundos da linhagem QM9414.

Os transformantes obtidos da linhagem QM6a foram nomeados CAX, de Cdna1-Azf1, onde X é um número de 1 a 7 representando cada transformante. Da mesma maneira, os transformantes obtidos a partir de QM9414 foram nomeados 4CAX, onde o 4 representa a linhagem de origem.

Para confirmar se o vetor pPcdna1-azf1 foi inserido com sucesso ao genoma de *T. reesei*, o DNA de cada transformante foi extraído e submetido a duas PCRs. Como esquematizado na Figura 7A, a primeira PCR verifica a presença ou ausência do gene marcador de seleção higromicina e a segunda PCR verifica a presença ou ausência do cassete *Pcdna1-azf1*.

Como observado na Figura 7B, todos os transformantes analisados apresentaram um amplicon de aproximadamente 850pb, correspondente a ORF da higromicina, também presente no controle positivo pPcdna1-azf1. Essa amplificação está ausente nos controles negativos. Da mesma forma, um amplicon de 1,1kb também pode ser observado em todos os transformantes analisados e no controle positivo, estando ausente nos controles negativos (Figura 7C). Esse amplicon refere-se a parte do promotor *Pcdna1* e parte do gene *azf1*. Portanto, esses resultados confirmam que o vetor pPcdna1-azf1 foi integrado com sucesso ao genoma das linhagens QM6a e QM9414 de *T. reesei*.

Figura 7. Confirmação da integração do vetor pPcdna1-azf1 ao genoma de *T. reesei*. (A) Representação esquemática da estratégia de verificação dos transformantes. (B) Amplificação da ORF da higromicina. (C) Amplificação de parte do cassete Pcdna1-azf1. C+: controle positivo (plasmídeo pPcdna1-azf1). B: branco, sem DNA. M: Marcador de peso molecular.

5.3. Análise da expressão de *azf1* nos mutantes obtidos

Uma vez que o cassete para superexpressar o gene *azf1* foi integrado com sucesso ao genoma de *T. reesei*, nós iniciamos a caracterização das linhagens mutantes. Como ponto de partida, foi analisada a expressão de *azf1*. Inicialmente, foram escolhidos o mutante CA3 e a linhagem parental QM6a.

Para analisar a expressão gênica, foram realizados dois cultivos: no primeiro, as linhagens QM6a e CA3 foram cultivadas diretamente em celulose

por 24, 48 e 72h; no segundo, as linhagens foram pré-cultivadas em glicerol por 24h e então transferidas para celulose e o micélio coletado após 24h. Além disso, foi feito um cultivo em glicose por 24h. Como mostrado na Figura 8, *azf1* não estava superexpresso em nenhuma condição analisada. Quando o micélio foi utilizado como inóculo, *azf1* se mostrou menos expresso no mutante CA3 ($p \leq 0,05$) (Figura 8B).

Figura 8. Expressão gênica absoluta de *azf1* nas linhagens QM6a e CA3. (A) As linhagens QM6a e CA3 foram cultivadas em celulose 1% por 24h, 48h e 72h. (B) As linhagens QM6a e CA3 foram pré-cultivadas em glicerol por 24h e os micélios transferidos para celulose e cultivados por 24h. As linhagens QM6a e CA3 foram cultivadas em glicose por 24h. p (*) $p \leq 0,05$.

Uma vez que *azf1* não estava superexpresso no mutante CA3, foi escolhido um outro transformante para caracterização. Para analisar a expressão de *azf1* no mutante 4CA1 e na linhagem parental QM9414, novamente foram realizados dois cultivos: no primeiro, as linhagens foram pré-cultivadas em glicerol por 24h e então transferidas para celulose e o micélio foi coletado após 8 e 24h; no segundo, os esporos das linhagens parental e mutante foram inoculados diretamente em celulose e cultivados por 24 e 48h. Também foi realizado um cultivo em glicose por 24h.

Desta vez, o gene *azf1* se mostrou altamente expresso no mutante 4CA1 em relação ao parental em praticamente todas as condições analisadas (Figura 9). Apesar de não apresentar diferença significativa no cultivo de 24h direto em celulose, o mutante 4CA1 apresentou um aumento de 11,43 vezes da expressão de *azf1* em relação ao parental QM9414. A análise da expressão também mostrou que *azf1* apresentou uma alta expressão no mutante no cultivo em

glicose, enquanto na linhagem parental a expressão é praticamente indetectável. Portanto, a linhagem 4CA1 foi escolhida para analisar os efeitos da superexpressão do fator de transcrição Azf1 na produção de celulases por *T. reesei*.

Figura 9. Expressão gênica absoluta de *azf1* nas linhagens QM9414 e 4CA1. As linhagens QM9414 e 4CA1 foram pré-cultivadas em glicerol por 24h e os micélios transferidos para celulose e cultivados por 8 e 24h. Os esporos também foram utilizados diretamente no cultivo em glicose (24h) e celulose (24h e 48h) (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

5.4. Análise do crescimento em diferentes fontes de carbono

Como caracterização fenotípica inicial, foi analisado se a superexpressão de Azf1 e/ou o processo de transformação afetam o crescimento e a formação de biomassa. Então, 10^6 esporos/mL das linhagens QM9414 e 4CA1 foram inoculados em meio Mandels-Andreotti contendo glicerol 1% (v/v) como fonte de carbono e cultivados por 24h. Como mostrado na Figura 10A, não houve diferença do peso seco entre as linhagens, indicando que elas são comparáveis. Assim sendo, nós continuamos utilizando glicerol 1% como fonte de crescimento para os fungos. Além disso, quando as linhagens parental e mutante foram crescidas em outras fontes de carbono, também não houve diferença na formação de biomassa entre as linhagens (Figura 10B).

Figura 10. Análise do crescimento das linhagens QM9414 e 4CA1 em diferentes fontes de carbono. (A) As linhagens foram crescidas em glicerol 1% (v/v) por 24h. (B) As linhagens foram crescidas em diferentes fontes de carbono (1% p/v) por 24h.

5.5. Análise da expressão gênica de holocelulases

Para entender os efeitos da superexpressão de Azf1 na produção de holocelulases por *T. reesei*, foi primeiramente feita uma análise a nível transcricional. As análises de expressão gênica por PCR em tempo real foram realizadas com os cDNAs utilizados na avaliação da expressão de *azf1*. Foram selecionados para análise de expressão alvos diretos de Azf1 previamente validados por ChIP-qPCR (*cel7a*, *cel45a* e *swo*), genes diferencialmente expressos no RNA-Seq (*xyn1*, *cel6a*, *cel3d* e *Tr56684*) e na PCR em tempo real

(*cel7b*, *cel61b* e *cel3b*) em experimentos utilizando as linhagens $\Delta azf1$ e TU6 (Antonieto *et al.*, 2019).

5.5.1. A superexpressão de Azf1 não afeta a expressão de celulases no cultivo em glicose

Como uma fonte de carbono de fácil metabolização, a glicose reprime a transcrição de genes relacionados à degradação de biomassa, via CCR. Então, nós analisamos se a superexpressão de Azf1 consegue, por si só, ativar a expressão de genes celulolíticos. Como mostrado na Figura 11A, a superexpressão de Azf1 não afetou a expressão de celulases em condições repressoras, exceto pelo gene *cel45a*, que é regulado diretamente por Azf1 em celulose (Antonieto *et al.*, 2019).

Figura 11. Efeitos da superexpressão de Azf1 no cultivo em glicose. (A) Expressão absoluta dos genes celulolíticos. (B) Western Blot para detecção de Azf1 nos extratos intracelulares das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em glicose. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Uma hipótese foi que o mRNA estivesse sendo sofrendo alguma regulação pós-transcricional e não estivesse sendo traduzido. Para testá-la, as proteínas intracelulares dos micélios das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivados em glicose foram extraídas e foi realizado um Western Blot para detectar a proteína Azf1. Como mostrado na Figura 11B, mesmo em condições repressores, Azf1 é traduzido na célula. A proteína constitutiva actina foi marcada na mesma membrana para normalizar a quantidade de proteína, mostrando que Azf1 está mais abundante no mutante 4CA1.

Assim sendo, esses resultados sugerem que o fator de transcrição Azf1 não sofre apenas uma regulação transcricional dependente da fonte de carbono, mas também pode ser alvo de regulações pós-traducionais e que sua superexpressão não consegue induzir a transcrição dos genes celulolíticos na ausência de um indutor.

5.5.2. A superexpressão de Azf1 reprime a expressão de celulasas

A caracterização do fator de transcrição Azf1 mostrou que ele é um regulador positivo da transcrição de celulasas, visto que sua deleção resultou em uma redução significativa na expressão dessas enzimas (Antonieto *et al.*, 2019). Portanto, nós acreditamos que a superexpressão de Azf1 causaria um aumento na expressão de holocelulasas por *T. reesei* na presença de fontes indutoras. De forma contraditória, a expressão da maioria dos genes relacionados à degradação da biomassa avaliados está reduzida no mutante 4CA1 (Figura 12).

Os genes da proteína acessória *swollenin* e da β -glicosidase Cel3b foram os únicos que se mostraram mais expressos em 4CA1 em alguma das condições analisadas (Figura 12C,I), sendo que ambos os genes também estão reprimidos após 48h e 24h de cultivo (pré-crescido em glicerol), respectivamente. O gene *swo* é regulado diretamente por Azf1 enquanto *cel3b* apresenta possíveis sítios de ligação para ele (Antonieto *et al.*, 2019). Outro alvo direto de Azf1, a principal celulase de *T. reesei*, *cel7a* mostrou uma redução na expressão em 4CA1 também após 24h de cultivo usando micélio como inóculo (Figura 12A), enquanto *cel45a* não mostrou diferença na expressão entre as linhagens parental e mutante (Figura 12D).

Interessantemente, é possível observar que a redução da expressão gênica ocorre nos estágios mais tardios do cultivo: quando o fungo foi pré-crescido em glicerol, após 24h, *cel6a*, *cel7b*, *cel61b*, *cel3b* e *Tr56684* estão reprimidos em 4CA1; e quando os esporos foram utilizados como inóculo, após 48h, é possível observar a repressão da expressão nos genes *swo*, *cel3d* e *cel61b*, enquanto o gene *xyn1* está reprimido na maioria das condições analisadas (Figura 12).

Figura 12. Expressão gênica de holocelulases em celulose. (A-J) Genes relacionados

à degradação da biomassa lignocelulósica (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Esses resultados nos levaram a hipotetizar que a superexpressão de Azf1 afeta a produção de celulases em uma maneira temporal. Nos tempos iniciais de cultivo, quando o fungo reconhece a fonte de carbono disponível – nesse caso, celulose – Azf1, superexpresso, ativa a transcrição de alguns genes de celulases. No entanto, no decorrer do cultivo, ocorre alguma regulação que se sobressai à superexpressão de Azf1 e causa a repressão da expressão de celulases.

5.5.3. Análise da expressão gênica dos reguladores Xyr1 e Cre1

Para compreender o porquê de a expressão de celulases estar reduzida quando Azf1 está superexpresso, nós primeiramente analisamos o comportamento dos principais fatores de transcrição que regulam a produção de celulases em *T. reesei*: Xyr1 e Cre1.

Figura 13. Expressão gênica dos fatores de transcrição Xyr1 (A) e Cre1 (B). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Xyr1, o principal ativador da transcrição de celulases, apresentou uma expressão significativamente menor no mutante 4CA1 em 24h de cultivo, após ser pré-cultivado em glicerol, e em 48h, cultivado direto em celulose (Figura 13A). Curiosamente, foram nessas mesmas condições que a maioria dos genes de celulases analisados estava reprimida (Figura 12). O principal repressor, Cre1, também apresentou uma repressão no mutante 4CA1 em 24h quando o fungo

foi pré-crescido em glicerol (Figura 13B). Esses resultados sugerem que a superexpressão de *Azf1* desencadeia mecanismos que reprimem a transcrição de *Xyr1*, o que pode estar causando a repressão da expressão das celulases.

5.5.4. Análise das redes regulatórias mediadas por *Azf1*

Em seguida, nós hipotetizamos se a superexpressão de *Azf1* poderia estar aumentando ou reduzindo demasiadamente a expressão de outros fatores de transcrição, acarretando na repressão dos genes celulolíticos. Análises transcriptômicas com as linhagens TU6 e $\Delta azf1$ cultivadas em bagaço-de-cana e glicerol mostraram que, entre os genes diferencialmente expressos, oito fatores de transcrição sofrem alguma regulação por *Azf1* (Tabela 4) (Antonieto *et al.*, 2019). Através da ferramenta FIMO (Grant, Bailey e Noble, 2011), nós buscamos possíveis sítios de *Azf1* nos promotores desses fatores de transcrição. Nossa análise mostrou que quatro são possíveis alvos diretos de *Azf1* (p -valor $\leq 0,0001$) (Figura 14A), então foi realizada uma PCR em tempo real para avaliar se a superexpressão de *Azf1* causava algum efeito na expressão desses FTs.

O fator de transcrição *Tr4921* apresentou um possível sítio de ligação para *Azf1*, sendo *up*-regulado por esse último nos dados de RNA-Seq (Figura 14A e Tabela 4). Em glicose, é possível observar um leve aumento na sua expressão no mutante 4CA1 enquanto na linhagem parental sua expressão é praticamente inexistente. Também de forma consistente com os dados obtidos no transcriptoma, a superexpressão de *Azf1* aumentou significativamente a expressão de *Tr4921* no cultivo em celulose após 24h (pré-crescido em glicerol). Quando os esporos foram utilizados como inóculo, *Tr4921* em 24h de cultivo está reprimido no mutante 4CA1, o que também pode ser causado por outros mecanismos regulatórios em *T. reesei* (Figura 14B).

Tr4921 codifica um fator de transcrição do tipo dedo de zinco C_2H_2 então foi possível gerar seu possível motivo de ligação por bioinformática (Figura 15A). A busca por sítios de ligação de *Tr4921* nos promotores dos genes avaliadas na PCR em tempo real permitiu identificar apenas dois possivelmente regulados diretamente por esse TF: *cel45a* e *cel3b* (Figura 15B, p -valor $\leq 0,0001$). Interessante, *cel45a* apresentou uma maior expressão no mutante 4CA1 em

glicose (Figura 11A), onde também é possível observar um aumento na expressão de *Tr4921* (Figura 14B). Possivelmente, *Azf1* e *Tr4921* de forma conjunta consigam ativar a expressão de *cel45a* em condições repressoras, porém análises mais profundas precisam ser realizadas para compreender melhor o papel de *Tr4921* na produção de celulases por *T. reesei*.

Figura 14. Fatores de transcrição regulados por *Azf1*. (A) Possíveis sítios de ligação para *Azf1* nos promotores dos fatores de transcrição diferencialmente expressos no RNA-Seq (p -valor $\leq 0,0001$). (B-E) Expressão gênica dos fatores de transcrição. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Figura 15. O fator de transcrição *Tr4921*. (A) Motivo de ligação de *Tr4921* predito por bioinformática. (B) Possíveis sítios de ligação de *Tr4921* nos promotores dos genes analisados na PCR em tempo real (p -valor $\leq 0,0001$).

Os fatores de transcrição *Tr108775* e *Tr111466* se mostraram *down*-regulados por Azf1 no RNA-Seq (Tabela 4). A superexpressão de Azf1 reduziu significativamente a expressão de *Tr108775* em uma das condições analisadas (Figura 14C), porém *Tr111466* apresentou maior expressão no mutante 4CA1 (Figura 14D). Novamente, outros mecanismos regulatórios podem estar ativando a transcrição de *Tr111466* ou então a relação de Azf1 com esse FT em celulose pode ser diferente da observada em bagaço-de-cana, uma fonte de carbono mais complexa e heterogênea, causando o aumento da sua expressão. Infelizmente, não foi possível gerar o motivo de ligação para esses FTs, visto que eles não são do tipo C₂H₂ e não possuem homólogos em *S. cerevisiae*. Portanto, não sabemos se eles possuem alvos diretos entre os genes de celulases avaliados.

O último fator de transcrição, *Tr58456*, também foi *down*-regulado por Azf1 no RNA-Seq (Tabela 4). Como mostrado na Figura 14D, esse gene está reprimido no mutante 4CA1 em glicose, porém em celulose a superexpressão de Azf1 não teve efeitos sobre a expressão de *Tr58456* (Figura 14E). Esse gene codifica um fator de transcrição do tipo dedo de zinco Zn₂Cys₆ e para gerar seu possível motivo de ligação, foi realizada uma busca por homólogos no genoma de *S. cerevisiae*. *Tr58456* é homólogo do fator de transcrição UPC2 (ID 30810)

de *S. cerevisiae* (56,2% identidade, *e-value* 2.35E-006), um regulador de genes da biossíntese do esteroide e que participa da via *Sterol regulatory element (SRE) binding proteins (SREBPs)* (Vik e Rine, 2001). O alinhamento das sequências mostrou que o domínio de ligação ao DNA é bastante conservado entre as proteínas (Figura 16A), então nós prosseguimos com as análises. O motivo de ligação de UPC2 resolvido por Gordan e coautores foi obtido no banco de dados YeTFaSCo (Figura 16B) e utilizado na busca por possíveis sítios de ligação nos promotores dos genes analisados através da ferramenta FIMO (Boer, De e Hughes, 2012; Gordân *et al.*, 2011; Grant, Bailey e Noble, 2011).

Figura 16. O fator de transcrição *Tr58456*. (A) Alinhamento entre as sequências de *Tr58456* e UPC2, seu homólogo em *S. cerevisiae*, na região de ligação do DNA (caixa preta). Os resíduos de cisteína estão destacados em vermelho. (B) Motivo de ligação do UPC2. (C) Possíveis sítios de ligação para UPC2 nos promotores dos genes de celulasas avaliados na PCR em tempo real (p -valor $\leq 0,0001$).

Nossa análise mostrou que quatro genes são possíveis alvos de *Tr58456*: *cel7a*, *cel6a*, *cel61b* e *Tr56684* (Figura 16C, p -valor $\leq 0,0001$), e todos foram reprimidos no mutante 4CA1 em pelo menos uma das condições analisadas (Figura 12A,B,H,J). Como *Tr58456* se mostrou mais expresso em glicose do que celulose e seguindo a lógica de que Azf1 é um regulador positivo da expressão de celulasas, é provável que *Tr58456* atue como um repressor da produção de celulasas, reprimido por Azf1 em glicose e bagaço-de-cana. Como não foi observado que a superexpressão de Azf1 reprime a expressão de *Tr58456* em

celulose (Figura 14E), esse último pode estar reprimido a expressão dos genes *cel7a*, *cel6a*, *cel61b* e *Tr56684*. No entanto, é necessário realizar a caracterização funcional de *Tr58456* para entender seu papel na regulação da expressão de celulases em *T. reesei*.

5.6. Dosagem de proteínas e atividade enzimática

Para avaliar se os resultados obtidos nas análises de expressão gênica refletiam na produção de proteínas, os sobrenadantes obtidos dos cultivos das linhagens QM9414 e 4CA1 em glicose (dialisado), glicerol (para crescimento do micélio) e de celulose (pré-crescido em glicerol) por 24h foram utilizados para dosar as atividades de celobiohidrolase (exoglicanase), CMCase (endoglicanase), β -glicosidase, β -xilosidase e xilanase.

Embora a expressão da maioria das celulases estivesse reduzida no mutante 4CA1, as atividades enzimáticas não mostraram diferença significativa em relação a linhagem parental (Figura 17A-E). Portanto, as atividades enzimáticas não refletem a repressão da expressão de celulases no mutante 4CA1.

Duas hipóteses podem explicar os resultados observados: (i) como discutido anteriormente, nos tempos iniciais do cultivo em celulose, a superexpressão de *Azf1* aumenta a produção de celulases, o que acaba suprimindo a repressão observada em 24h de cultivo ou (ii) a superexpressão de *Azf1* tem um efeito positivo na regulação pós-transcricional dos genes de celulases, como processamento do mRNA e/ou na tradução/secreção das proteínas.

Além disso, esses resultados também mostram que não houve atividade detectável nos cultivos em glicerol e glicose, reforçando que a superexpressão de *Azf1* não aumenta a produção de celulases na ausência de um indutor.

Usando o método de Bradford, a concentração de proteínas secretadas pelas linhagens parental e mutante no cultivo em celulose foi mensurada e novamente não apresentou diferença significativa (Figura 17F). Um volume de 2 mL do sobrenadante de cada linhagem foi precipitado e o mesmo volume foi submetido ao SDS-Page. Como mostrado na Figura 18, os perfis de bandas do

secretoma entre as replicatas das linhagens QM9414 e 4CA1 são visualmente semelhantes.

Figura 17. Atividades enzimáticas no sobrenadante do cultivo das linhagens QM9414 e 4CA1 em glicerol, celulose e glicose (A-E). (A) Celobiohidrolase (B) CMCase (C) β -glicosidase (D) β -xilosidase (E) Xilanase (F) Concentração de proteínas no sobrenadante do cultivo em celulose.

Figura 18. SDS-Page para visualização do secretoma das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 24h.

5.7. A superexpressão de Azf1 aumenta a produção de β -glicosidases intracelulares

O genoma de *T. reesei* codifica 11 β -glicosidases. As mais estudadas são a Cel3a/BglI, a β -glicosidase extracelular mais produzida por esse fungo, e Cel1a e Cel1b, β -glicosidases intracelulares (Zou *et al.*, 2018). Essas β -glicosidases intracelulares possuem um papel importante na regulação da expressão de celulases em diferentes fontes de carbono, visto que são responsáveis por hidrolisar a celobiose que é transportada para o interior da célula (Nitta *et al.*, 2012).

Cel1a e Cel1b apresentam possíveis sítios de ligação para Azf1 nas suas regiões promotoras (Figura 19A) (Antonieto *et al.*, 2019). Portanto, nós avaliamos a expressão desses genes nas linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose. A superexpressão de Azf1 aumentou significativamente a expressão de *cel1a* e *cel1b* nos cultivos de 48h e 24h (pré-crescido em glicerol), respectivamente (Figura 19B,C).

Para verificar se o aumento da expressão de *cel1a* e *cel1b* era refletido na tradução das proteínas, os micélios das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 24h, pré-crescidas em glicerol, foram utilizados para extração

das proteínas intracelulares e dosagem da atividade de β -glicosidase. Consistente com os resultados de expressão gênica, o mutante 4CA1 apresentou maior atividade de β -glicosidase no extrato intracelular (Figura 19D). Portanto, a superexpressão de Azf1 aumenta a produção das β -glicosidases intracelulares.

Figura 19. Azf1 regula positivamente a produção de β -glicosidases intracelulares. (A) Possíveis sítios de ligação para Azf1 nos promotores dos genes *cel1a* e *cel1b*. (B) Expressão gênica de *cel1a*. (C) Expressão gênica de *cel1b*. (D) Atividade de β -glicosidase do extrato intracelular das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 24h (pré-crescidas em glicerol). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Interessantemente, o aumento da expressão de *cel1a* e *cel1b* ocorre nas condições onde a maioria dos genes das celulasas estão reprimidos: em 24h quando o fungo foi pré-cultivado em glicerol e 48h quando não houve o pré-cultivo (Figura 12). Como essas enzimas são responsáveis pela hidrólise da celobiose no ambiente intracelular, nossos resultados indicam que a

superexpressão de Azf1 aumenta a produção dessas β -glicosidases, o que aumenta a taxa de hidrólise da celobiose na célula, liberando muita glicose. A glicose presente na célula ativa a repressão catabólica de carbono que, por meio do fator de transcrição Cre1, reprime a expressão de celulasas, como foi observado.

5.8. A superexpressão de Azf1 aumenta a produção de celulasas a longo prazo

Para entender melhor os efeitos da superexpressão de Azf1 na produção de celulasas por *T. reesei*, as linhagens QM9414 e 4CA1 foram crescidas em glicerol 1% (v/v) por 24h e os micélios foram então transferidos para novos frascos contendo celulose ou bagaço-de-cana 1% (p/v) e cultivados por 96h, onde alíquotas de 2 mL eram retiradas à cada 24h para dosagem de atividade enzimática.

Em ambas as fontes de carbono, as linhagens se comportaram de maneira similar, com a atividade crescendo a cada 24h (Figuras 20 e 21). Porém, no cultivo em celulose a partir de 72h, o mutante 4CA1 apresentou maiores valores da atividade de CMCase (Figura 20B). Já em bagaço-de-cana, a superexpressão de Azf1 causou um aumento na atividade de celobiohidrolase em 96h de cultivo (Figura 21A). Portanto, esses resultados indicam que, a longo prazo, a superexpressão de Azf1 consegue aumentar a produção de celulasas por *T. reesei*.

Figura 20. Atividade enzimática das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em celulose por 96h. (A) Celobiohidrolase (B) CMCase (C) β-glicosidase (D) β-xilosidase (E) Xilanase. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Figura 21. Atividade enzimática das linhagens QM9414 e 4CA1 cultivadas em bagaço-de-cana por 96h. (A) Celobiohidrolase (B) CMCase (C) β-glicosidase (D) β-xilosidase (E) Xilanase. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Trichoderma reesei possui um complexo e finamente controlado sistema celulolítico. A regulação orquestrada desse sistema permite o fungo reconhecer os nutrientes disponíveis e captá-los de forma eficiente sem gastos desnecessários de energia. Investigações profundas identificaram diversos mecanismos regulatórios e fatores de transcrição envolvidos na regulação da produção de holocelulases por *T. reesei*.

Entre esses reguladores, nosso grupo identificou um novo, homólogo a Azf1 de *S. cerevisiae*, que apresentou uma alta expressão gênica na presença de derivados da parede celular de plantas, como celulose e bagaço-de-cana, atuando como um regulador positivo da produção de celulases em *T. reesei*. A deleção desse novo fator de transcrição comprometeu a expressão de diversas celulases e hemicelulases, além de reduzir a atividade enzimática (Antonieto *et al.*, 2019). Neste presente trabalho, novos mecanismos regulatórios envolvendo Azf1 foram identificados através da sua superexpressão em *T. reesei*.

Para superexpressar Azf1, o promotor escolhido foi do gene *cdna1*, *Pcdna1*, que não possui função caracterizada. Embora pouco utilizado para superexpressar genes em *T. reesei*, *Pcdna1* é caracterizado como um promotor forte. Algumas celulases sob controle de *Pcdna1* foram produzidas em grande quantidade quando *T. reesei* foi cultivado em glicose (Nakari-Setälä e Penttilä, 1995; Uzbas *et al.*, 2012). Além disso, a superexpressão do fator de transcrição Xyr1 utilizando *Pcdna1* também aumentou a produção de celulases no cultivo em celulose (Wang, L., Lv, *et al.*, 2019). Quando analisamos a expressão de *azf1* no transformante CA3 (obtido a partir da linhagem QM6a), não foi observado um aumento da expressão (Figura 8). Outros transformantes obtidos a partir de QM6a não foram analisados para entendermos melhor a razão pela qual *azf1* não está superexpresso. Uma hipótese é que a maquinaria transcricional do fungo pode estar reconhecendo um ATG adjacente ao da ORF de *azf1*, levando à sua transcrição errônea. Porém, o promotor *Pcdna1* conseguiu superexpressar o gene *azf1* no transformante 4CA1, obtido a partir da linhagem QM9414, onde foi possível identificar altos níveis de transcritos em relação ao parental tanto em glicose como em celulose (Figura 9).

Primeiramente, foi avaliado se a superexpressão de Azf1 podia aumentar a expressão de celulases na presença de glicose, uma fonte repressora. Embora Azf1 estivesse mais abundante no mutante 4CA1, tanto em nível transcricional quanto em proteína (Figuras 9 e 11B), sua superexpressão não teve efeitos sobre a transcrição dos genes de celulases (Figura 11A), o que foi corroborado pela ausência de atividade de enzimática (Figura 17). A endoglicanase *cel45a* foi o único gene que apresentou um aumento significativo da expressão na linhagem mutante (Figura 11A). Esses resultados sugerem que Azf1, por si só, não consegue induzir a expressão de celulases na ausência de um indutor. Isso é observado em alguns fungos degradadores de biomassa. Em *P. oxalicum* e *A. nidulans*, por exemplo, a superexpressão do fator de transcrição ClrB, o principal regulador da expressão de celulases nesses fungos, também não induziu a expressão de celulases na ausência de um indutor (Coradetti, Xiong e Glass, 2013; Li *et al.*, 2015).

Em *T. reesei*, o remodelamento da cromatina possui um papel importante na regulação da expressão de celulases. Sabe-se que o *status* da cromatina é dependente das condições indutora ou repressora (Mello-de-Sousa *et al.*, 2015). Por exemplo, o rearranjo do nucleossoma nas regiões promotoras dos genes *cel7a* e *cel6a* são necessários para que haja a expressão gênica (Ries *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2003). Os principais reguladores da expressão de celulases em *T. reesei*, Xyr1 e Cre1, estão envolvidos no remodelamento da cromatina (Mello-de-Sousa *et al.*, 2015; Mello-De-Sousa *et al.*, 2016). Estudos mostraram que Xyr1 interage diretamente com a subunidade TrSNF12 do complexo SWI/SNF, um conservado remodelador de cromatina dependente de ATP (Cao *et al.*, 2019). Além disso, Xyr1 apresenta uma relação de interdependência com a proteína Lae1, uma possível metil-transferase (Seiboth *et al.*, 2012). Como em glicose a cromatina apresenta-se de forma condensada nas regiões dos genes de celulases para reprimir a expressão gênica, nós acreditamos que Azf1 não consegue acessar os promotores dos genes e assim iniciar a transcrição.

Nossos resultados também sugerem que o fator de transcrição Azf1 não sofre apenas uma regulação a nível transcricional dependente da fonte de carbono, mas também pode ser alvo de regulações pós-traducionais. Modificações pós-traducionais como a fosforilação regulam a função proteica, interação proteína-proteína, localização subcelular, transdução de sinal, etc.

Sabe-se que a fosforilação dos fatores de transcrição Cre1 e Ace2 são importantes para sua ligação ao DNA (Cziferszky, Mach e Kubicek, 2002; Stricker *et al.*, 2008). No homólogo de Cre1 em *A. nidulans*, CreA, a fosforilação regula sua localização subcelular (Ribeiro *et al.*, 2019). A partir da análise da sequência de aminoácidos de Azf1, utilizando as ferramentas NetPhos (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) e NetworkKIN (networkin.info), foram preditos 81 sítios de fosforilação, onde os sítios com maiores scores são para a proteína quinase C (Pkc). Assim sendo, uma regulação pós-traducional pode ser uma outra explicação para que Azf1 não induza a expressão de celulases em condições repressoras.

Em seguida, nós analisamos os efeitos da superexpressão de Azf1 em condições indutoras. As linhagens parental e mutante foram crescidas em celulose por diferentes períodos e a expressão gênica de algumas celulases e do transportador *Tr56684* foram avaliadas por PCR em tempo real. Foi observado que nos estágios iniciais de cultivo (8h, quando houve o pré-crescimento em glicerol, ou 24h, quando os esporos foram inoculados direto em celulose), a superexpressão de Azf1 aumenta a expressão dos genes *swo* e *ce/3b*, porém não tem efeitos na expressão da maioria dos outros genes. No decorrer do cultivo, nos tempos de 24h (pré-crescido em glicerol) ou 48h, a expressão da maioria dos genes está reduzida no mutante 4CA1 (Figura 12). Xyr1, o principal ativador da expressão de celulases, também está reprimido em 4CA1 nas mesmas condições (Figura 13A), o que pode explicar a repressão da expressão gênica observada.

Interessante, o sobrenadante do cultivo de 24h (pré-crescido em glicerol) foi utilizado para dosagem de proteínas e atividade enzimática, que não mostrou diferença significativa entre as linhagens parental e mutante (Figuras 17). Isso nos leva a duas hipóteses: (i) a superexpressão de Azf1 aumenta a produção de celulases nas primeiras horas de cultivo, suprimindo a repressão observada em 24h de cultivo ou (ii) Azf1 tem um papel na regulação pós-transcricional dos genes de celulases e sua superexpressão aumenta eventos como processamento do mRNA e/ou tradução/secreção das proteínas. Em *T. reesei*, o receptor acoplado à proteína G CSG1 está envolvido em mecanismos pós-transcricionais dos genes de celulases na presença de celulose e lactose (Stappler *et al.*, 2017). Em outro fungo celulolítico, *N. crassa*, a sub-unidade β

CPC-2 da proteína G também possui um papel na regulação pós-transcricional dos genes celulolíticos, assim como a enzima Adenilato ciclase e seu produto AMPc (Collier, Ghosh e Borkovich, 2020).

Como Azf1 é um regulador positivo da produção de celulases em *T. reesei*, nós focamos em entender por que sua superexpressão ocasionou a repressão dos genes celulolíticos. Primeiramente, analisamos a expressão dos fatores de transcrição Xyr1 e Cre1 e, como discuto acima, Xyr1 está reprimido nas mesmas condições que a maioria dos genes analisados. Em seguida, nós analisamos a expressão gênica dos quatro fatores de transcrição possíveis alvos diretos de Azf1 e diferencialmente expressos no RNA-Seq (Tabela 4, Figura 14). Exceto pelo gene *Tr111466*, todos os FTs tiveram sua expressão modulada de forma consistente com os dados obtidos no RNA-Seq em alguma das condições analisadas.

O fator de transcrição *Tr4921* apresenta possíveis sítios de ligação na região promotora dos genes *cel45a* e *cel3b* (Figura 15). A superexpressão de Azf1 aumentou levemente a expressão de *Tr4921* em glicose, onde também é possível observar um aumento significativo da expressão de *cel45a*. Esses resultados sugerem que Azf1 e *Tr4921* podem conjuntamente ativar a expressão dessa celulase em condições repressoras.

Tr58456 é homólogo do fator de transcrição de *S. cerevisiae* UPC2, que possui possíveis sítios de ligação nos promotores dos genes *cel7a*, *cel6a*, *cel61b* e *Tr56684* (Figura 16C). A superexpressão de Azf1 reprime a expressão de *Tr58456* em glicose, porém não afeta sua expressão em celulose (Figura 14E). Como Azf1 é um regulador positivo, é mais lógico que ele reprima reguladores negativos. Somado ao fato de *Tr58456* estar mais expresso em glicose, nós presumimos que esse último atua como repressor da expressão de celulases, podendo ser responsável pela redução da expressão de *cel7a*, *cel6a*, *cel61b* e *Tr56684*. Interessante, UPC2 participa da via SREBP, que regula a biossíntese de esterol (Vik e Rine, 2001). Em fungos, além de regular a homeostase de esterol, a via SREBP está envolvida em adaptação à hipoxia, resistência a drogas e virulência (Bien e Espenshade, 2010). Em *N. crassa* e *T. reesei*, a via SREBP atua como um regulador negativo da secreção de proteínas em condições lignocelulolíticas (Reilly *et al.*, 2015). Uma investigação profunda dessa via em *N. crassa* mostrou que ela reprime a expressão de LPMOs, que

requerem oxigênio molecular para atividade catalítica (Qin, Wu e Glass, 2017). Curiosamente, a LMPO Cel61b apresenta uma expressão reduzida e nossas análises mostraram que possuem possíveis sítios para UPC2. Porém, é necessário uma caracterização mais profunda da via SREBP em *T. reesei*, assim como do fator de transcrição *Tr56684*, para entender seus papéis na expressão e secreção de celulasas.

Como as β -glicosidases intracelulares possuem um importante papel na indução da expressão de celulasas (Nitta *et al.*, 2012) e Azf1 possivelmente regula diretamente as enzimas Cel1a e Cel1b (Antonieto *et al.*, 2019), nós investigamos se a superexpressão de Azf1 afeta a produção de β -glicosidases intracelulares em *T. reesei*. Ambas as enzimas Cel1a e Cel1b estão significativamente mais expressas no mutante 4CA1 (Figura 19A,B), o que ocasionou um aumento da atividade de β -glicosidase no extrato intracelular (Figura 19D). Os genes de *cel1a* e *cel1b* estão mais expressos nas mesmas condições em que houve a repressão dos genes de celulasas e do fator de transcrição Xyr1: 24h, quando houve o pré-crescimento em glicerol, e 48h, quando os esporos foram utilizados como inóculo. Nossos resultados sugerem que o aumento da produção de β -glicosidases intracelulares pode ter ocasionado a repressão da expressão de celulasas que observamos.

As β -glicosidases intracelulares Cel1a e Cel1b possuem um papel importante na produção de celulasas em *T. reesei*, pois regulam a taxa de hidrólise da celobiose. A deleção desses genes causa um atraso na indução da produção de celulasas na presença de celulose e lactose, mas não em sorbose e celobiose (Xu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2012). Nós acreditamos que os altos níveis de Cel1a e Cel1b no mutante 4CA1 aumentam a taxa de hidrólise da celobiose. A glicose resultante dessa hidrólise ativa a repressão catabólica de carbono e então Cre1 move-se para o núcleo e reprime os genes de celulasas e do ativador Xyr1 (Lichius *et al.*, 2014). Interessante, a linhagem hipercelulolítica de *T. reesei* PC-3-7 apresenta uma mutação no gene *cel1a*, o que produz uma enzima com uma taxa metabólica de celobiose reduzida, causando um alívio da CCR, o que melhora a produção de celulasas (Shida *et al.*, 2015). Além disso, a deleção do fator de transcrição BglR, um ativador da expressão de β -glicosidases, resulta no aumento da produção de celulasas devido ao carregamento gradual de celobiose para o meio intracelular (Nitta *et al.*, 2012).

Em *N. crassa*, as deleções dos três principais genes de β -glucosidase induzem a produção de celulases na presença de celobiose e esta indução recupera, tanto a nível transcricional como proteico, a resposta do fungo selvagem à celulose (Znameroski *et al.*, 2012). Esses resultados demonstram a importância das β -glicosidasas intracelulares na produção de celulases em diferentes organismos. Um modelo hipotético dos mecanismos regulatórios causados pela superexpressão de Azf1 em *T. reesei* está representado na Figura 22.

Figura 22. Modelo hipotético dos mecanismos regulatórios causados pela superexpressão de Azf1 ($Azf1^+$). (A) Em glicose, $Azf1^+$ ativa a transcrição da celulase Cel45a e do fator de transcrição *Tr4921* e reprime a expressão de *Tr58456*. *Tr4921* também pode ativar a transcrição de Cel45a. (B) A ação sinérgica de endo e exoglicanases libera celobiose que é transportada para o citosol. $Azf1^+$ aumenta a produção de celulases, especialmente das β -glicosidasas intracelulares Cel1a e Cel1b, que hidrolisam a celobiose. A glicose resultante ativa a CCR e Cre1 move-se para o núcleo, onde reprime a expressão de celulases e o principal ativador Xyr1.

Para analisar se a superexpressão de Azf1 poderia aumentar a produção de holocelulases pelo fungo, as linhagens parental e mutante foram crescidas nas complexas fontes de carbono celulose e bagaço-de-cana durante 4 dias. O perfil de atividade enzimática entre as linhagens foi bastante celular, especialmente nos períodos iniciais de cultivo. Porém, houve um aumento da atividade de CMCase no mutante 4CA1 em celulose nos períodos de 72 e 96h (Figura 20B). Já em bagaço-de-cana, houve um aumento da atividade de celobiohidrolase em 96h de cultivo no mutante 4CA1 (Figura 21A). As atividades

de β -glicosidase, β -xilosidase e xilanase em nenhum momento divergiram entre as linhagens. Portanto, esses resultados mostram que a superexpressão de Azf1 aumenta a produção de celulasas a longo prazo.

A regulação transcricional dos genes holocelulolíticos é um mecanismo crucial na degradação de biomassa por *T. reesei*. Os fatores de transcrição desempenham um importante papel nessa regulação, coordenando de forma orquestrada a expressão gênica de enzimas, transportadores e outras proteínas. Este trabalho investigou de forma mais profunda o papel do regulador Azf1 na produção de celulasas através de sua superexpressão. Nossos resultados sugerem que Azf1 pode ser alvo de regulações pós-traducionais e estar envolvido no controle pós-transcricional da produção de celulasas. Além disso, sua superexpressão aumentou, a curto período, a produção de β -glicosidases intracelulares e de celulasas em geral em cultivos de longo período. Esses resultados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares acerca da regulação da expressão gênica de celulasas em *T. reesei*.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

- O promotor *Pcdna1* conseguiu superexpressar o gene *azf1* em condições indutoras e repressoras na linhagem 4CA1.
- Em glicose, embora mais abundante a níveis transcricionais e proteicos, Azf1 não consegue ativar a expressão gênica de celulases, sugerindo uma possível regulação pós-traducional ou que Azf1 não está envolvido no remodelamento da cromatina.
- Em celulose, a superexpressão de Azf1, nos estágios iniciais de cultivo, aumenta a expressão da proteína *swo* e das β -glicosidases *cel1a*, *cel1b* e *cel3b*. O aumento da produção dessas β -glicosidases, por sua vez, por estar causando um aumento da taxa de hidrólise da celobiose, que ativa a CCR e causa repressão dos genes de celulases e do fator de transcrição Xyr1 nos estágios mais tardios do cultivo.
- Azf1 atua em conjunto com outros fatores de transcrição, como o *Tr4921*, para ativar a expressão de holocelulases. Além de reprimir a transcrição de *Tr58456*, possível repressor da expressão de celulases.
- Embora a expressão de celulases esteja reduzida no mutante 4CA1, essa repressão não reflete na atividade enzimática, o que pode indicar que Azf1 tem um efeito positivo no controle pós-transcricional dos genes celulolíticos.
- A superexpressão de Azf1 aumentou a produção de celulases após 3 dias de cultivo em celulose e após 4 dias de cultivo em bagaço de cana.

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAZI, E.; RAM, A. F. J. Modulating Transcriptional Regulation of Plant Biomass Degrading Enzyme Networks for Rational Design of Industrial Fungal Strains. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. September, p. 1–12, 2018.

ALI, N. *et al.* Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

AMORIM, H. V. *et al.* Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.

ANTONIETO, A. C. C. *et al.* A Novel Cys2His2 Zinc Finger Homolog of AZF1 Modulates Holocellulase Expression in *Trichoderma reesei*. **mSystems**, v. 4, n. 4, p. 1–14, 18 jun. 2019.

ANTONIÊTO, A. C. C. *et al.* Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, p. 93–103, 2014.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

ARO, N. *et al.* ACEII, a Novel Transcriptional Activator Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24309–24314, 2001.

____. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 56–65, 2003.

BAILEY, T. L. *et al.* MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 202–208, 2009.

BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p.

8711–8724, 2019.

BARUAH, J. *et al.* Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, n. DEC, p. 1–19, 2018.

BEIER, S. *et al.* CLR1 and CLR2 are light dependent regulators of xylanase and pectinase genes in *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 136, n. November 2019, p. 103315, 2020.

BENOCCHI, T. *et al.* Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 152, 12 dez. 2017.

BIEN, C. M.; ESPENSHADE, P. J. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: Hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 3, p. 352–359, 2010.

BOER, C. G. DE; HUGHES, T. R. YeTFaSCo: A database of evaluated yeast transcription factor sequence specificities. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 169–179, 2012.

BORIN, G. P. *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.

BRÖHL, S. *et al.* A new nuclear suppressor system for a mitochondrial RNA polymerase mutant identifies an unusual zinc-finger protein and a polyglutamine domain protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 10, n. 6, p. 719–731, 1994.

CAO, Y. *et al.* Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 65–83, 2017.

_____. *Trichoderma reesei* XYR1 recruits SWI/SNF to facilitate cellulase gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 1145–1162, 2019.

CASTRO, L. D. S. *et al.* Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. **Gene Expression Patterns**, v. 14, n. 2, p. 88–

95, 2014.

CHEN, L. *et al.* Characterization of the Ca²⁺-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 560–575, 2016.

COLLIER, L. A.; GHOSH, A.; BORKOVICH, K. A. Heterotrimeric G-Protein Signaling Is Required for Cellulose Degradation in *Neurospora crassa*. **mBio**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 24 nov. 2020.

CORADETTI, S. T. *et al.* Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7397–7402, 2012.

CORADETTI, S. T.; XIONG, Y.; GLASS, N. L. Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer-independent production of cellulolytic enzymes in *Neurospora crassa*. **MicrobiologyOpen**, v. 2, n. 4, p. 595–609, 2013.

CZIFERSZKY, A.; MACH, R. L.; KUBICEK, C. P. Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14688–14694, 2002.

DERNTL, C. *et al.* Xpp1 regulates the expression of xylanases, but not of cellulases in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

DERNTL, C.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R. Fusion transcription factors for strong, constitutive expression of cellulases and xylanases in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 231, 30 dez. 2019.

FEOFILOVA, E. P.; MYSYAKINA, I. S. Lignin: Chemical structure, biodegradation, and practical application (a review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 573–581, 25 nov. 2016.

FILIATRAULT-CHASTEL, C. *et al.* AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. **Biotechnology for**

Biofuels, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2019.

FURUKAWA, T. *et al.* Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 8, p. 564–574, 2009.

GORDÂN, R. *et al.* Curated collection of yeast transcription factor DNA binding specificity data reveals novel structural and gene regulatory insights. **Genome Biology**, v. 12, n. 12, 2011.

GRANT, C. E.; BAILEY, T. L.; NOBLE, W. S. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1017–1018, 2011.

GRUBER, F. *et al.* The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. **Current Genetics**, v. 18, n. 1, p. 71–76, 1990.

GUPTA, V. K. *et al.* The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei* : What's Next? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 970–982, dez. 2016.

HÄKKINEN, M. *et al.* Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–26, 2012.

____. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, 2014.

HAN, L. *et al.* Precision engineering of the transcription factor Cre1 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) for efficient cellulase production in the presence of glucose Running title: Cre1 engineering for efficient cellulase production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. July, p. 1–9, 2020.

ILMÉN, M. *et al.* Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 4, p. 1298–1306, 1997.

IVANOVA, C. *et al.* Genome sequencing and transcriptome analysis of *Trichoderma reesei* QM9978 strain reveals a distal chromosome translocation to be responsible for loss of *vib1* expression and loss of cellulase induction.

Biotechnology for Biofuels, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2017.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KARIMI-AGHCHEH, R. *et al.* Functional analyses of *Trichoderma reesei* LAE1 reveal conserved and contrasting roles of this regulator. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 2, p. 369–378, 2013.

KARIMI AGHCHEH, R. *et al.* The VELVET a orthologue VEL1 of *trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

KIESENHOFER, D. P.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R. Influence of cis element arrangement on promoter strength in *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 1–15, 2018.

KILBANE, J. J. Future applications of biotechnology to the energy industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 4–7, 2016.

KIM, I. J. *et al.* Type-dependent action modes of TtAA9E and TaAA9A acting on cellulose and differently pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2017.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

LANGSTON, J. A. *et al.* Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 7007–7015, 2011.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O etanol combustível no Brasil. **Biocombustíveis no Brasil: Realidades e perspectivas**, p. 61–75, 2008.

LI, C. *et al.* A β -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2016.

LI, Z. *et al.* Synergistic and Dose-Controlled Regulation of Cellulase Gene

Expression in *Penicillium oxalicum*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 9, p. 1–45, 2015.

LICHIUS, A. *et al.* Nucleo-cytoplasmic shuttling dynamics of the transcriptional regulators XYR1 and CRE1 under conditions of cellulase and xylanase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 94, n. 5, p. 1162–1178, 2014.

LIU, R. *et al.* A novel transcription factor specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.

MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 583–604, 2006.

MANDELS, M.; PARRISH, F. W.; T., R. E. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **Journal of bacteriology**, v. 83, n. Cx, p. 400–408, 1962.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73, n. 2, p. 269–278, 1957.

MARTINEZ, D. *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 2008.

MARTINS-SANTANA, L. *et al.* CRZ1 regulator and calcium cooperatively modulate holocellulases gene expression in *Trichoderma reesei* QM6a. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 1–12, 2020.

MELLO-DE-SOUSA, T. M. *et al.* A truncated form of the Carbon catabolite repressor 1 increases cellulase production in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

_____. The impact of chromatin remodelling on cellulase expression in *Trichoderma reesei*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2015.

MELLO-DE-SOUSA, T. M. *et al.* The Relation Between Promoter Chromatin Status, Xyr1 and Cellulase Expression in *Trichoderma reesei*. **Current Genomics**, v. 17, p. 145–152, 2016.

MENG, Q. S. *et al.* Identification of a novel repressor encoded by the putative gene *ctf1* for cellulase biosynthesis in *Trichoderma reesei* through artificial zinc finger engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 6, p. 1747–1760, 2020.

NAKARI-SETALA, T.; PENTTILA, M. Production of *Trichoderma reesei* cellulases glucose-containing media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3650–3655, 1995.

NEWCOMB, L. L.; HALL, D. D.; HEIDEMAN, W. AZF1 Is a Glucose-Dependent Positive Regulator of CLN3 Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 5, p. 1607–1614, 2002.

NITTA, M. *et al.* A new Zn(II) 2Cys 6-type transcription factor BglR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 5, p. 388–397, 2012.

NOGUEIRA, K. M. V. *et al.* Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2018.

NORGREN, M.; EDLUND, H. Lignin: Recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 409–416, 2014.

NOVY, V. *et al.* The influence of feedstock characteristics on enzyme production in *Trichoderma reesei*: A review on productivity, gene regulation and secretion profiles. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2019.

PAULA, R. G. DE *et al.* New Genomic Approaches to Enhance Biomass Degradation by the Industrial Fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1–17, 2018.

_____. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. **Biotechnology Advances**, n. January, p. 0–1, 2019.

PEÑA-CASTRO, J. M. *et al.* Biotechnological Strategies to Improve Plant Biomass Quality for Bioethanol Production. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. [s.l: s.n.]. v. 2

PERSIKOV, A. V.; SINGH, M. De novo prediction of DNA-binding specificities for Cys2His 2 zinc finger proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 97–108, 2014.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 58–68, 2012.

PHILIPPINI, R. R. *et al.* Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, n. July, p. 1–23, 2020.

PINO, M. S. *et al.* Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, n. November 2017, p. 119–136, 2018.

QIAN, Y. *et al.* The GATA-Type transcriptional factor are1 modulates the expression of extracellular proteases and cellulases in *trichoderma reesei*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 1–15, 2019.

QIN, L.; WU, V. W.; GLASS, N. L. Deciphering the Regulatory Network between the SREBP Pathway and Protein Secretion in *Neurospora crassa*. **mBio**, v. 8, n. 2, p. 1–16, 3 maio 2017.

QUINLAN, R. J. *et al.* Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.

RAUSCHER, R. *et al.* Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 3, p. 447–456, 2006.

REILLY, M. C. *et al.* Deletion of homologs of the SREPB pathway results in hyper-production of cellulases in *Neurospora crassa* and *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.

RIBEIRO, L. F. C. *et al.* Comprehensive analysis of *aspergillus nidulans* PKA phosphorylome identifies a novel mode of CreA regulation. **mBio**, v. 10, n. 2, p.

1–13, 2019.

RIES, L. *et al.* The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 749–762, 2014.

SAGASTUME GUTIÉRREZ, A. *et al.* The energy potential of agriculture, agroindustrial, livestock, and slaughterhouse biomass wastes through direct combustion and anaerobic digestion. The case of Colombia. **Journal of Cleaner Production**, v. 269, 2020.

SALOHEIMO, A. *et al.* Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5817–5825, 2000.

SALOHEIMO, M. *et al.* Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202–4211, 2002.

SAMAL, A. *et al.* Network reconstruction and systems analysis of plant cell wall deconstruction by *Neurospora crassa*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2017.

SANTOS CASTRO, L. DOS *et al.* Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, 2014.

SANTOS CASTRO, L. DOS *et al.* Understanding the Role of the Master Regulator XYR1 in *Trichoderma reesei* by Global Transcriptional Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–16, 16 fev. 2016.

SARSEKEYEVA, F. *et al.* Cyanofuels: Biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 1–2, p. 329–340, 2015.

SCHMOLL, M. *et al.* The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 205–327, 2016.

SEIBOTH, B. *et al.* The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 1150–1164, 23 jun. 2012.

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH, V. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, n. May 2014, 2011.

SHIDA, Y. *et al.* The impact of a single-nucleotide mutation of *bgl2* on cellulase induction in a *Trichoderma reesei* mutant. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.

SLATTERY, M. G.; LIKO, D.; HEIDEMAN, W. The function and properties of the *Azf1* transcriptional regulator change with growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 2, p. 313–320, 2006.

STAPPLER, E. *et al.* Analysis of Light- and Carbon-Specific Transcriptomes Implicates a Class of G-Protein-Coupled Receptors in Cellulose Sensing. **mSphere**, v. 2, n. 3, p. 1–19, 2017.

STEIN, T. *et al.* *Azf1p* is a nuclear-localized zinc-finger protein that is preferentially expressed under non-fermentative growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 34, n. 4, p. 287–296, 1998.

STRICKER, A. R. *et al.* *Xyr1* (Xylanase Regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 12, p. 2128–2137, 2006.

_____. Role of *Ace2* (Activator of Cellulases 2) within the *xyn2* transcriptosome of *Hypocrea jecorina*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 4, p. 436–445, 2008.

SUN, X. *et al.* Engineering the *cbh1* Promoter of *Trichoderma reesei* for Enhanced Protein Production by Replacing the Binding Sites of a Transcription Repressor *ACE1* to Those of the Activators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1337–1346, 2020.

UZBAS, F. *et al.* A homologous production system for *Trichoderma reesei* secreted proteins in a cellulase-free background. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 93, n. 4, p. 1601–1608, 2012.

VIK, Å.; RINE, J. Upc2p and Ecm22p, Dual Regulators of Sterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 19, p. 6395–6405, 2001.

VOSS, T. C.; HAGER, G. L. Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 2, p. 69–81, 2014.

WANG, F. *et al.* Use of fusion transcription factors to reprogram cellulase transcription and enable efficient cellulase production in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019.

WANG, L.; LV, X.; *et al.* A novel transcriptional regulator RXE1 modulates the essential transactivator XYR1 and cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4511–4523, 2019.

WANG, L.; YANG, R.; *et al.* CLP1, a novel plant homeo domain protein, participates in regulating cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, 2019.

XIN, Q. *et al.* *Trichoderma reesei* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal growth, conidiation, and cellulase gene expression. **Current Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 580–589, 2013.

XIONG, Y.; SUN, J.; GLASS, N. L. VIB1, a Link between Glucose Signaling and Carbon Catabolite Repression, Is Essential for Plant Cell Wall Degradation by *Neurospora crassa*. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 8, 2014.

XU, J. *et al.* Intracellular β -glucosidases CEL1a and CEL1b are essential for cellulase induction on lactose in *Trichoderma reesei*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 8, p. 1001–1013, 2014.

ZEILINGER, S. *et al.* The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, n. 1, p. 56–63, 2001.

____. Nucleosome transactions on the Hypocrea jecorina (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 270, n. 1, p. 46–55, 2003.

ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; DING, S.-Y. Visualizing chemical functionality in plant cell walls. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 263, 30 dez. 2017.

ZHANG, F. *et al.* **Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 4

ZHANG, F.; ZHAO, X.; BAI, F. Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30 by overexpression of a novel regulatory gene *Trvib-1*. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 676–683, 2018.

ZHANG, J. *et al.* The transcription factor ACE3 controls cellulase activities and lactose metabolism via two additional regulators in the fungus *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 48, p. 18435–18450, 2019.

ZHANG, W. *et al.* Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 32861–32872, 2013.

ZHANG, X. *et al.* Constitutive cellulase production from glucose using the recombinant *Trichoderma reesei* strain overexpressing an artificial transcription activator. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 317–322, 2017.

ZHOU, Q. *et al.* Differential involvement of β -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 11, p. 1371–1381, 2012.

ZNAMEROSKI, E. A. *et al.* Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6012–6017, 2012.

ZOU, G. *et al.* Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–12, 2012.

____. The putative β -glucosidase BGL3I regulates cellulase induction in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 314, 2018.