UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Paula Fagundes de Gouvêa

**Estudos genéticos e moleculares da produção de
celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e
*Aspergillus niger***

Ribeirão Preto

2013

Paula Fagundes de Gouvêa

**Estudos genéticos e moleculares da produção de
celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e
*Aspergillus niger***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Ribeirão Preto

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Gouvêa, Paula Fagundes de

Estudos genéticos e moleculares da produção de celulasas e hemicelulasas em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*. Ribeirão Preto, 2013.

205 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique.

1. *Aspergillus nidulans*. 2. *Aspergillus niger*. 3. celulase. 4. hemicelulase. 5. bagaço de cana-de-açúcar explodido. 6. *xlnR*. 7. *creA*. 8. repressão catabólica do carbono 9. xilanase. 10. *snfA*. 11. *schA*.

Paula Fagundes de Gouvêa

Estudos Genéticos e Moleculares da produção de celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

*Aos meus queridos pais Isabel e Sérgio. Obrigada pelo exemplo de vida,
confiança, amor, apoio e dedicação sempre concedidos a mim.*

*Ao Alexandre, meu marido, por me ensinar que a cada dia podemos
recomeçar, acreditar e seguir sempre em frente.*

*Aos meus irmãos, Viviane e João Luís, minha eterna gratidão e
carinho. Que meu exemplo possa impulsioná-los a almejar coisas novas
cada vez mais!*

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman**,

Obrigado pela grande oportunidade desde a minha iniciação científica, pelo apoio e pelos ensinamentos compartilhados ao longo do meu trabalho e de todos os oito anos que estive no laboratório.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro ao laboratório e pela bolsa de iniciação científica e mestrado concedidas a mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo apoio financeiro ao laboratório.

Agradecimentos

Aos meus pais, **Isabel e Sérgio**, vocês são os meus maiores exemplos e por quem eu luto todo dia para alcançar os meus objetivos. Obrigada por tudo! Esta vitória é de vocês também! Eu amo vocês!

Aos meus irmãos, **Viviane e João Luis**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e amparando...obrigado por vocês existirem, vocês são os melhores irmãos do mundo!!

Ao meu marido, **Alexandre**, por fazer os momentos difíceis se tornarem simples, pelo carinho, dedicação e por estar sempre me apoiando ao longo desta jornada, gostaria de agradecer principalmente pela sua compreensão e paciência (e quanta, né Lê!). Te amo muito!!!

Ao meu avô **Álvaro**, tios, tias, primos e primas, em especial meus padrinhos **Ana Márcia e Vicente**, pela torcida, apoio e incentivo durante mais esta etapa da minha vida.

À minha segunda família **D. Wanda, Sr. Octávio, Reinaldo e Renata, Carlos e Cláudia** e meus queridos sobrinhos **Gustavo, Luis Guilherme, Carolina e Júlia**. Obrigada pelo apoio, incentivo e carinho.

Aos meus amigos **Beto, Rose, Carol, Augusto**, obrigado pelos momentos de alegria que passamos juntos e pelo carinho.

Faz um pouquinho de tempo que estou no laboratório, e durante esses quase oito anos muitas pessoas passaram por aqui, algumas ainda permanecem e outras já seguiram seu caminho, de qualquer forma todas moram em meu coração e gostaria muito de agradecer imensamente cada uma delas, seja pelo ótimo convívio, pelas ajudas (Marcela sempre disposta a ajudar!), gargalhadas, choros, happy hour (nossa, quase todos do laboratório, em especial Ana e Marcela...rs), cantorias (Pati canta muito bem!), joguinhos de mini vôlei nos finais de tarde, ajuda para ser aprovada na qualificação (né, Thaila! Obrigada!!!), vizinhas de bancadas (Babinha adorava ser minha vizinha! Agora, Enyara adora também!) além de muitas outros momentos que seria impossível descrever todos aqui. Por isso gostaria de lembrar dos amigos deste e de outros

tempos, Prof^a. Dra. **Márcia Eliana F. da S. Balieiro** (foi a primeira pessoa que me ensinou ciência!), Prof^a. Dra. **Márcia R. Von Zeska Kress**, Prof. Dr. **Frederico M. Soriani**, Prof. Dr. **Iran Malavazi**, Prof. Dr. **Luciano Ângelo Bernardes**, Prof^a Dra. **Taisa Magnani**, Prof^a. Dra. **Nádia Krohn**, Prof. Dr. **Ricardo S. C. de Almeida**, Dra. **Marcela Savoldi**, Dr. **Neil A. Brown**, Dra. **Thaila F. dos Reis**, Dra. **Enyara R. Moraes**, Dra. **Lizziane K. Winkelströter**, Dra. **Andresa Berretta**, Dr. **Wagner R. de Souza**, Dra. **Simone**, Ms. **Bárbara de C. Figueiredo**, Ms. **Ana Cristina Colabardini**, Ms. **Patrícia A. de Castro**, Ms. **Livia Marangoni**, **Sara R. Carvalho**, **Angélica Batista**, **Luciano Akira Takami**, **Vinicius Leite Pedro Bom**, **Paulo S. de Carvalho**. Agradeço por sempre proporcionarem um ótimo convívio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Prof^a. Dra. **Maria Helena de Souza Goldman**, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras USP, Ribeirão Preto pelo apoio e por todo suporte técnico.

Ao Prof. Dr. **João Jorge Atilio**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela doação do bagaço de cana-de-açúcar explodido.

Ao Prof. Dr. **Mário Murakami**, Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, Campinas, aos seus alunos e técnica **Andréia Meza**, por me acolherem muito bem e me ensinarem técnicas para expressão e purificação de proteínas.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, juntamente com os professores da seção de Pós-Graduação em Bioquímica desta mesma unidade e funcionários, em especial a secretária do Departamento, a **Ivone**, que sempre foi muito atenciosa e ajudou muito com os problemas burocráticos sendo muito paciente comigo,

A todos os professores que contribuíram com o envio de cepas, plasmídeos, troca de informações e sugestões.

A todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto.

À **Deus**, por estar sempre comigo e me permitir vencer mais uma etapa em minha vida!

Tua caminhada ainda não terminou....
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita
é quase chegar a perfeição.
A juventude precisa de sonhos
e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios
precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

RESUMO

GOUVÊA, P. F. **Estudos genéticos e moleculares da produção de celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger***. 2013. 205f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O mundo se depara atualmente com a perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol combustível. O bagaço de cana está entre os maiores subprodutos agroindustriais no Brasil, sendo uma das alternativas na utilização para a produção do etanol de segunda geração. A degradação do bagaço de cana requer a ação de muitas enzimas diferentes que são reguladas transcricionalmente. Considerando-se que o custo de celulases e hemicelulases contribuem substancialmente no preço do bioetanol, novos estudos visando o entendimento da eficiência e produtividade de celulases são de grande importância. Para entender como melhorar coquetéis de enzimas que podem hidrolizar o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, utilizou-se um experimento de genômica para investigar-se quais genes e vias são transcricionalmente moduladas durante o crescimento de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar explodido. Neste trabalho foram identificados genes que codificam celulases e hemicelulases com aumento da expressão durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido. Foi também realizada a determinação do acúmulo de mRNA de diversos genes que codificam transportadores para verificar se estes eram induzidos por xilose e por dependência de glicose. Foram identificados 18 genes que corresponde a 58% de celulases preditas em *A. niger* e 21 genes que corresponde a 58% de hemicelulases preditas em *A. niger* os quais foram altamente expressos durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido. Foi investigado também o papel central realizado pelas proteínas quinases e fosfatases não essenciais (NPKs e NPPs, respectivamente) quando em presença de celulose como fonte de carbono, no sensoramento do estado energético e na subsequente via de sinalização no fungo filamentosso modelo *Aspergillus nidulans*. O estudo com *A. nidulans* identificou 11 quinases e 7 fosfatases não essenciais, NPKs e NPPs, respectivamente, envolvidas na produção de celulases e em alguns casos, na produção também de hemicelulases. O envolvimento destas NPKs identificadas na resposta induzida por avicel e na desrepressão foram acessados pela análise do transcriptoma da cepa selvagem e por microscopia de fluorescência através da cepa de fusão CreA::GFP expressa no selvagem e no background dos mutantes de NPKs. A ausência das quinases *snfA* e *schA* reduziu dramaticamente a resposta transcricional induzida por celulose incluindo a expressão de enzimas hidrolíticas e transportadores, enquanto que a ausência de *snfA* resultou em uma quase completa modulação gênica induzida por celulose. O mecanismo pelo qual essas duas quinases controlam a transcrição gênica foi identificado, onde os dois mutantes de quinases foram capazes de desbloquear o CreA mediante a repressão catabólica do carbono (CCR), sob condições de desrepressão, como em baixa presença de carbono ou crescimento em celulose. Desta forma, este trabalho abriu novas possibilidades para o entendimento da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por hidrolases de *A. niger* e para a construção de coquetéis de enzimas mais eficientes para a obtenção do etanol de segunda geração. Também possibilitou a identificação de muitas quinases e fosfatases envolvidas no sensoramento do carbono e do estado energético, as quais demonstraram papéis sobrespontos e distintos de *snfA* e *schA* na regulação da desrepressão de CreA e na produção de enzimas hidrolíticas em *A. nidulans*.

Palavras chave: *Aspergillus niger*, celulase, hemicelulase, bagaço de cana-de-açúcar explodido, *xlnR*, *creA*, *A. nidulans*, repressão catabólica do carbono, xilanase, *snfA*, *schA*.

ABSTRACT

GOUVÊA, P. F. **The genetic and molecular studies of cellulase and hemicellulase production in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger***. 2013. 205 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The world today is faced with the prospect of a significant increase in demand for fuel ethanol. Sugarcane bagasse is among the largest agro-industrial by-products in Brazil, one of the alternatives in use for the production of second generation ethanol. Degradation of sugarcane bagasse requires the action of many different enzymes which are transcriptionally regulated. Considering that the costs of cellulases and hemicellulases contribute substantially to the price of bioethanol, new studies aimed at understanding and improving cellulase efficiency and productivity are of paramount importance. To understand how to improve enzymatic cocktails that can hydrolyze pretreated sugarcane bagasse, we used a genomics approach to investigate which genes and pathways are transcriptionally modulated during growth of *A. niger* on steam-exploded sugarcane bagasse. We also sought to determine whether the mRNA accumulation of several steam-exploded sugarcane bagasse-induced genes encoding putative transporters is induced by xylose and dependent on glucose. We identified 18 genes that corresponds to 58% of *A. niger* predicted cellulases and 21 genes that correspond to 58% of *A. niger* predicted hemicellulases, that were highly expressed during growth on sugarcane bagasse. The central role performed by non-essential protein kinases (NPK) and phosphatases (NPP) when grown on cellulose as a sole carbon source, in the sensing energetic status and the subsequent signalling pathways was assessed in the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. This study identified multiple kinases and phosphatases (NPKs and NPPs, respectively) involved in the sensing of carbon or energetic status, while demonstrating the overlapping and distinct roles of *snfA* and *schA* in the regulation of CreA derepression and hydrolytic enzyme production in *A.nidulans*. The involvement of the identified NPKs in avicel-induced responses and CreA derepression was assessed by genome-wide transcriptomics and fluorescent microscopy of a CreA::GFP fusion proteinexpressed in the wild-type and NPK-deficient mutant backgrounds. The absence of either the *schA* or *snfA* kinase dramatically reduced cellulose-induced transcriptional responses including the expression of hydrolytic enzymes and transporters, while the absence *snfA* resulted in a near complete loss of wild-typecellulose-induced gene modulation. The mechanism by which these two NPKs controlled gene transcription was identified, as neither of NPK-deficient mutants were able to unlock CreA-mediated carbon catabolite repression, under derepressing conditions, such as carbon starvation or growth on cellulose. Our presently reported work opens new possibilities for understanding sugarcane biomass saccharification by *A. niger* hydrolases and for the construction of more efficient enzymatic cocktails for second-generation bioethanol. This work also enable the identification of multiple kinases and phosphatases involved in the sensing of carbon or energetic status, while demonstrating the overlapping and distinct roles of *snfA* and *schA* in the regulation of CreA derepression and hydrolytic enzyme production in *A.nidulans*.

Key words: *Aspergillus niger*, cellulase, hemicellulase, steam-exploded sugarcane bagasse, *xlnR*, *creA*, *A. nidulans*, carbon catabolite repression, xylanase, *snfA*, *schA*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema do processo de produção do bioetanol de segunda geração	23
FIGURA 2 - Modelo esquemático da parede celular vegetal.....	25
FIGURA 3 - A estrutura molecular da celulose	26
FIGURA 4 - A estrutura molecular da xilana e suas enzimas hidrolíticas.....	26
FIGURA 5 - Estrutura molecular da pectina.....	27
FIGURA 6 - Estrutura molecular da lignina.....	27
FIGURA 7 - Estrutura esquemática da celulose com as enzimas β -glucosidase (BGL) celobiohidrolase (CBH) e a enzima β -1,4-endoglucanase.....	29
FIGURA 8 - Estrutura esquemática das pectinas ramnogalacturona I, homogalacturona e xilogalacturona com suas enzimas pectinolíticas.....	32
FIGURA 9 - Sistemas enzimáticos de degradação da celulose e hemicelulose.....	35
FIGURA 10 - Representação esquemática dos domínios funcionais de XlnR de <i>A. niger</i>	38
FIGURA 11 - Ciclo de vida do fungo filamentoso <i>Aspergillus nidulans</i>	46
FIGURA 12 - Estratégia para obtenção do cassete de fusão com GFP.....	62
FIGURA 13 - Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> em bagaço de cana-de-açúcar explodido	88
FIGURA 14 - Atividade enzimática de xilanase e celulase na presença de xilose 1%, xilana 1% e bagaço de cana-de-açúcar não explodido e explodido.....	90
FIGURA 15 - Clusterização hierárquica comparando-se o padrão de expressão de <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana explodido	94
FIGURA 16 - Eletroforese de proteínas secretadas para o meio extracelular em <i>A. niger</i> após crescimento em bagaço por 24 horas.....	106
FIGURA 17 - A redução no crescimento específico em avicel das onze NPKs	116

FIGURA 18 - A redução na transcrição e produção de enzimas hidrolíticas nos mutantes de NPKs.....	119
FIGURA 19 - Dosagem da atividade de PKA em diferentes fontes de carbono.....	122
FIGURA 20 - Localização nuclear de CreA::GFP em condições de repressão e desrepressão.....	124
FIGURA 21 - Identificação de genes modulados pelos mutantes $\Delta schA$, $\Delta snfA$ e pela cepa selvagem em MM+avicel 1%.....	129
FIGURA 22 - Contribuição de <i>snfA</i> e <i>schA</i> na indução de genes em avicel 1%.	130
FIGURA 23 - A redução da transcrição de enzimas celulolíticas e xilanolíticas em <i>schA</i> e <i>snfA</i>	132
FIGURA 24 - As sete NPPs necessárias para o crescimento em avicel 1%	134

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sistemas catabólicos sujeitos à repressão de carbono em <i>Aspergilli</i> ...	40
TABELA 2 - Genótipos das linhagens de <i>A. nidulans</i> e <i>A. niger</i> utilizadas neste trabalho.....	50
TABELA 3 - Linhagem de levedura utilizada neste trabalho	50
TABELA 4 - Vetores utilizados neste trabalho.....	50
TABELA 5 - Soluções estoque de requisistos nutricionais recomendados para complementação de auxotrofias em <i>A. nidulans</i>	58
TABELA 6 - Descrição de primers de <i>A. nidulans</i> utilizados neste trabalho.....	63
TABELA 7 - Descrição de primers e sondas fluorescentes LUX® e TaqMan® de <i>A. nidulans</i> e <i>A. niger</i> utilizados neste trabalho.....	71
TABELA 8 - Genes preditos de <i>A. niger</i> que codificam celulasas que tiveram aumento do acúmulo de mRNA durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido quando comparado com o crescimento em frutose (controle de referência).....	96
TABELA 9 - Genes preditos de <i>A. niger</i> que codificam hemicelulasas que tiveram aumento do acúmulo de mRNA durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido quando comparado com o crescimento em frutose (controle referência).....	97
TABELA 10 - Expressão gênica medida por RT-PCR em tempo real de genes que codificam celulasas, hemicelulasas, xilose redutase e <i>xlnR</i> de <i>A. niger</i> durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.	100
TABELA 11 - Genes preditos de <i>A. niger</i> que codificam transportadores que tiveram aumento do acúmulo de mRNA durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido quando comparado com o crescimento em frutose (controle referência).....	102
TABELA 12 - Expressão gênica medida por RT-PCR em tempo real de genes que codificam transportadores de <i>A. niger</i> durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.....	103
TABELA 13 - Expressão gênica medida por RT-PCR em tempo real de genes que codificam transportadores de <i>A. niger</i> em presença de xilose ou xilose + glicose.....	104

TABELA 14 - Identificação de proteínas por espectrometria de massa de sobrenadantes de <i>A. niger</i> durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.....	107
TABELA 15 - Sítios conservados nas cascatas de sensoriamento e sinalização de nutriente, metabolismo de carboidratos e crescimento celular das onze NPKs que tiveram redução no crescimento em avicel 1%	117
TABELA 16 - Localização nuclear de CreA::GFP após transferência para meio contendo diferentes fontes de carbono.....	125
TABELA 17 - Número total de genes diferencialmente expressos após transferência de meio completo para MM+avicel 1% por 8 e 24 horas nas cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$	127
TABELA 18 – Os termos GO mais representados na análise FetGOat dos genes diferencialmente expressos nas cepas selvagem e $\Delta schA$ após transferência de meio completo para MM + avicel 1% por 24 horas.....	128
TABELA 19 – Descrição funcional de sete fosfatases que apresentaram redução de crescimento radial em MM+ avicel 1% e redução da transcrição de <i>eglA/B</i>	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPC	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
BE	Bagaço de cana-de-açúcar explodido
BGL	Beta-glicosidase
BSA	Albumina de soro bovino
CAZy	"Carbohydrate active enzyme"
CBH	Celobiohidrolase
CBM	Módulo de ligação ao carboidrato
CCR	Repressão catabólica do carbono
cDNA	DNA complementar
CE	Carboidrato esterase
CPT	Camptotecina
Da	Dalton
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamina tetraacético
EGL	Endoglucanase
Fg	Fentograma
G	Gravidade
GFP	Green fluorescent protein
GH	Glicosídeo hidrolase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Kb	Kilo bases
KCl	Cloreto de potássio
kV	Kilovolt

LB	Meio Luria Betani
<i>mA</i>	Mili ampere
Mb	Mega bases
MC	Meio Completo
MM	Meio Mínimo
mM	Mili molar
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenada
NPKs	Quinases não essenciais
NPPs	Fosfatases não essenciais
NXA	Mutação de perda de função
ORF	Região aberta de leitura (“open reading frame”)
p/v	Peso/volume
PBS	Salina fosfato tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PL	Liase polissacarídico
pyrG	Gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase de <i>A. fumigatus</i>
r^2	Coeficiente de correlação
RNA	Ácido Ribonucleíco
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SC	Meio sintético para leveduras
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 O etanol de segunda geração: obtenção do etanol celulósico	22
1.2 Estrutura e degradação da parede celular vegetal por fungos filamentosos.....	25
1.3 A regulação das enzimas hidrolíticas em fungos filamentosos.....	35
1.4 O fator de transcrição XlnR de <i>A. niger</i>	36
1.4.1 Reguladores transcricionais em outros sistemas fungicos	38
1.5 A repressão de carbono em fungos filamentosos.....	39
1.5.1 A proteína repressora CreA.....	41
1.6 O fungo <i>A. nidulans</i> como modelo experimental	43
 2. Objetivos.....	 47
 3. Materiais e Métodos.....	 49
3.1 Genótipos das linhagens utilizadas nesse trabalho	50
3.2 Linhagem de <i>S. cerevisiae</i> utilizada neste trabalho	50
3.3 Vetores utilizados neste trabalho.....	50
3.4 Meios de Cultura.....	51
3.4.1 Meios de cultura para <i>Aspergilli</i>	51
3.4.1.1 Meio mínimo para <i>A. niger</i> (MM).....	51
3.4.1.2 Meio mínimo para <i>A. nidulans</i> (MM).....	51
3.4.1.3 Meio completo para <i>A. niger</i> (MC)	52
3.4.1.4 Meio completo para <i>A. nidulans</i> (YAG, YUU, YG e YG+UU).....	52
3.4.2 Meio de cultura para <i>Escherichia coli</i>	52
3.4.2.1 Meio Luria Bertani (LB).....	52
3.4.3 Meio de cultura para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
3.4.3.1 Meio YPD	53
3.4.3.2 Meio Sintético para leveduras (SC).....	53
3.5 Soluções e tampões.....	53
3.5.1 Solução de sais 20X concentrada para MM de <i>A. niger</i>	53
3.5.2 Solução de sais 20X concentrada para MM de <i>A. nidulans</i>	54
3.5.3 Solução de elementos traços para <i>A. niger</i>	54
3.5.4 Solução de elementos traços para <i>A. nidulans</i>	55
3.5.5 Soluções para transformação em <i>Aspergilli</i>	55

3.5.5.1 Solução 1 de protoplastização	55
3.5.5.2 Solução 2 de protoplastização	55
3.5.5.3 Solução 3 de transformação	56
3.5.5.4 Solução 4 de transformação	56
3.5.5.5 Solução 5 de transformação	56
3.5.6 Soluções para miniprepação de DNA plasmidial	56
3.5.6.1. Solução de lise alcalina	56
3.5.6.2 Solução de neutralização	57
3.5.7 Soluções para microscopia.....	57
3.5.7.1 Solução estoque de Hoescht 33258.....	57
3.5.7.2 Solução estoque de Azul de Toluidina	57
3.5.7.3 Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado	57
3.5.7.4 Solução estoque de 2-deoxi-glicose.....	57
3.5.7.5 Solução estoque de 6-deoxi-glicose.....	58
3.5.8 Solução estoque de camptotecina	58
3.5.9. Soluções estoque de requisitos nutricionais	58
3.5.10 Soluções para eletroforese.....	59
3.5.10.1 Tampão MOPS 10X concentrado	59
3.5.10.2 Tampão de amostra para eletroforese de RNA	59
3.5.10.3 Tampão de amostra para eletroforese de DNA	59
3.5.10.4 Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado.....	59
Dissolveu-se os componentes no volume necessário.	59
3.5.10.5 Tampão de extração de DNA.....	60
3.5.10.6 Tampão de extração de proteína	60
3.6 Protocolos experimentais	60
3.6.1 Produção do cassete de fusão pela técnica de recombinação “in vivo” em <i>S. cerevisiae</i>	60
3.6.2 Transformação em <i>Aspergilli</i>	64
3.6.2.1 Produção de protoplastos.....	64
3.6.2.2 Transformação	64
3.6.3 Extração de DNA genômico de <i>Aspergilli</i>	65
3.6.4 Extração de DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	66
3.6.5 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	66
3.6.6 Eletrotransformação de <i>E. coli</i>	67
3.6.7 Minipreparação do DNA plasmidial.....	67

3.6.8 Extração e manipulação de proteínas em <i>A. nidulans</i>	68
3.6.9 Extração e manipulação de RNA em <i>A. nidulans</i> e <i>A. niger</i>	68
3.6.10 Reação de PCR em tempo real (“Real time RT-PCR”)	70
3.6.11 Determinação do peso seco em <i>A. nidulans</i>	72
3.6.12 Dosagem da atividade enzimática de PKA em <i>A. nidulans</i>	72
3.6.13 Cruzamentos entre linhagens de <i>A. nidulans</i>	73
3.6.14 Experimentos de microscopia de fluorescência em <i>A. nidulans</i>	73
3.6.14.1 Análise da cepa CreA::GFP em glicose 1% e avicel 1%	74
3.6.14.2 Análise da cepa CreA::GFP em diferentes fontes de carbono.....	74
3.6.14.3 Análise da cepa CreA::GFP em presença de 2-deoxi-glicose e 6-deoxi-glicose.....	74
3.6.14.4 Análise das cepas CreA::GFPx Δ snfA, CreA::GFPx Δ schA e CreA::GFPx Δ atmA em glicose 1% e avicel 1%	75
3.6.15 Análise de <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido com Azul de Toluidina.....	75
3.6.16 Dosagem da atividade de xilanase e celulase em <i>A. niger</i> e <i>A. nidulans</i>	76
3.6.17 Análise de expressão gênica das cepas selvagem, Δ schA e Δ snfA de <i>A. nidulans</i> através de hibridações de <i>microarray</i>	76
3.6.17.1 Extração e manipulação de RNA para as hibridações de <i>microarray</i> em <i>A. nidulans</i>	76
3.6.17.2 Marcação e hibridização dos RNAs e geração das imagens de <i>microarray</i> de <i>A. nidulans</i>	77
3.6.17.3 Análise das imagens e dados obtidos do <i>microarray</i> de <i>A. nidulans</i>	78
3.6.18 Análise de expressão gênica de <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido através de hibridações de <i>microarray</i>	79
3.6.18.1 Extração e manipulação de RNA para as hibridações de <i>microarray</i> em <i>A. niger</i>	79
3.6.18.2 Marcação e hibridização dos RNAs e geração das imagens de <i>microarray</i>	80
3.6.18.3 Análise das imagens e dados obtidos do <i>microarray</i> de <i>A. niger</i>	81
3.6.19 Extração e manipulação de proteínas para análise do secretoma de <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido.....	82
3.6.20 Espectrometria de massa por MALDI-TOF.....	83
3.6.21 Estoque de linhagens.....	84
3.6.22 Análise estatística	84

4. Resultados e Discussão	85
Módulo 4.1: Análise do transcriptoma de <i>Aspergillus niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido.....	86
4.1.1 Análise do crescimento de <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido.....	87
4.1.2 Determinação da atividade de celulase e xilanase em <i>Aspergillus niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido	89
4.1.3 Identificação de genes modulados em <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido através de hibridações de <i>microarray</i>	92
4.1.4 Validação das análises das hibridações de <i>microarray</i> por RT-PCR em tempo real	99
4.1.4.1 Genes que codificam celulases e xilanases	99
4.1.4.2 Genes que codificam transportadores.....	101
4.1.5 Identificação <i>in silico</i> de motivos de ligação do fator de transcrição XlnR.....	104
4.1.6. Análise do secretoma de <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido.....	105
4.1.7 Discussão	108
Módulo 4.2: Caracterização funcional de proteínas quinases e fosfatases não essenciais na regulação da produção de enzimas hidrolíticas em <i>Aspergillus nidulans</i>	114
4.2.1 “Screening” da coleção de quinases não essenciais (NPKs) envolvidas na produção de celulases	115
4.2.2 Avaliação das NPKs na “repressão catabólica do carbono” (CCR) através da sub-localização celular de CreA	122
4.2.3 Identificação de genes modulados nas cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$ crescidas em avicel 1% através de hibridações de <i>microarray</i>	126
4.2.4 “Screening” da coleção de fosfatases não essenciais (“non-essential phosphatases – NPPs”) envolvidas na produção de celulases.....	133
4.2.5 Discussão	138
5. Conclusões	142
6. Referências Bibliográficas	146
7. Apêndices	168
Apêndice A: Artigo Publicado.....	169
Apêndice B: Artigo aceito para publicação.....	188

1. Introdução

1.1 O etanol de segunda geração: obtenção do etanol celulósico

O mundo se depara atualmente com a perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol combustível e para tanto, torna-se necessário se investir no desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol de segunda geração. Essa nova geração representa uma alternativa para o uso energético da biomassa, apresentando vantagens ambientais e econômicas, como por exemplo, o fato de ser uma fonte renovável de energia e contribuir para a redução da emissão do dióxido de carbono (PACHECO, 2011).

O etanol de segunda geração pode ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos, os quais encontram-se presentes em resíduos de origem vegetal como palha de milho, lascas de madeira, capim, bagaço de cana-de-açúcar e algas. Estes materiais são compostos por três frações principais: celulose, hemiceluloses e lignina. O bagaço de cana está entre os maiores subprodutos agro-industriais no Brasil, sendo uma das alternativas, se não a principal, na utilização para a produção do etanol de segunda geração. Este resíduo consiste de material fibroso que provém do caule da cana-de-açúcar após a maceração deste e a extração do caldo da planta para a produção do etanol de primeira geração. Dois terços da cana são constituídos de material lignocelulósico sendo composto por 40-50% de celulose, 25-35% de hemicelulose e 15-20% de lignina (RAGAUSKA et al., 2006). A lignina e hemicelulose envolvem as microfibrilas de celulose, conferindo proteção contra produtos químicos e/ou a degradação biológica. Em conjunto, estas frações compõem mais de 90% da massa do material seco (KUHAD et al., 1997).

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis (MACEDO et al., 2008). A Figura 1 apresenta um diagrama de fluxo da produção de bioetanol de segunda geração. É estimado que os custos do capital associados com o etanol lignocelulósico estão em torno de US\$ 4 por galão e que estes necessitam ser reduzidos mais do que a metade para serem economicamente viáveis (GRAY et al., 2006).

Figura 1 - Esquema do processo de produção do bioetanol de segunda geração. (Figura extraída de: Seabra, 2008).

A completa utilização do substrato é um dos pré-requisitos para tornar os processos do etanol lignocelulósico economicamente competitivos. Os monossacarídeos contidos na celulose como a glicose e na hemicelulose como a xilose, arabinose, glicose, manose, galactose, entre outros representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol e outros produtos, por meio de fermentação. No entanto, a estreita associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que ela impõe grandes dificuldades para recuperar os açúcares constituintes sob a forma de monômeros com elevado grau de pureza (SUN; CHENG, 2002).

Neste contexto, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta diversos desafios técnicos para a sua conversão em açúcares monoméricos adequados para processos de fermentação. O bagaço é altamente recalcitrante, sendo que a primeira etapa no processamento do bagaço para produção de etanol é o pré-tratamento mecânico ou químico eficaz, que visa destruir a estrutura celular do bagaço para a posterior hidrólise enzimática (ROSA; GARCIA, 2009). Tanto o pré-tratamento e a hidrólise enzimática têm sido frequentemente apontados como os passos mais dispendiosos no bioprocessamento deste material lignocelulósico. Sendo assim, acredita-se que para a sacarificação enzimática eficiente da celulose do bagaço, os pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos geralmente representam as melhores opções para fracionar a lignocelulose (RAMOS, 2003).

O pré-tratamento pode ser realizado de acordo com diferentes princípios. Entre os diferentes métodos de pré-tratamento, a hidrólise da hemicelulose com ácidos

diluídos, a temperaturas elevadas, seguido ou não por descompressão súbita (explosão), é uma das principais tecnologias (WYMAN et al. 2005). Ela representa uma estratégia de pré-tratamento amplamente relatada na literatura, testada com sucesso em escala piloto e com potencial para aplicação em escala comercial (JORGENSEN et al. 2007). Após o pré-tratamento, a biomassa é submetida à separação da lignina e da hemicelulose. A lignina é muito difícil de ser tratada quimicamente, e seu papel nos processos em desenvolvimento estará limitada, provavelmente, a fornecer energia térmica. Quanto à hemicelulose, esta pode ser hidrolisada sem maiores problemas com as técnicas hoje disponíveis. A operação central dos processos em análise é a hidrólise propriamente dita, que possibilita, pela atuação de determinados catalisadores, a quebra das cadeias de polissacarídeos, tendo como resultado moléculas de açúcar. Uma vez obtidos os açúcares, seguem-se as etapas de fermentação e destilação, exatamente como no processo da geração do etanol de primeira geração.

O Brasil apresenta vantagens competitivas em relação aos outros países na produção do etanol de segunda geração, como por exemplo, o menor custo e a fácil disponibilidade de grandes quantidades de matéria prima, especialmente diante da possibilidade de uso do bagaço e da palha da cana nestes novos processos. Essa tecnologia poderá, também, ser integrada à estrutura existente nas unidades produtoras, reduzindo os custos de instalação e operação. Além disso, a gradual implantação da colheita mecanizada, a proibição da queima da palha da cana e a tendência de utilização de caldeiras de alto desempenho resultarão em excedentes de bagaço e palha que poderão ser transformados em etanol de segunda geração.

No Brasil, a construção da primeira usina de etanol celulósico em escala comercial do país, com previsão de inauguração no início de 2014 em Alagoas, representa um grande avanço para o Brasil porque o coloca entre os países que já tem planos concretos de utilização dessa tecnologia. Embora em fase inicial de implantação, o bioetanol de segunda geração apresenta grande potencial de crescimento, pois não depende da produção de alimentos para a sua industrialização e nem da expansão da área plantada com cana-de-açúcar, e sim do reaproveitamento dos resíduos da produção de etanol e açúcar, que já são abundantes (UNICA, 2013). Sendo assim, atualmente predomina a idéia de que, para o futuro próximo, entre cinco e dez anos, a tecnologia de produção de bioetanol por meio da hidrólise de materiais celulósicos em grande escala venha a representar essa tão sonhada alternativa.

1.2 Estrutura e degradação da parede celular vegetal por fungos filamentosos

A parede celular vegetal é constituída de lignocelulose, o biomaterial mais abundante na natureza, o qual é composto essencialmente por polissacarídeos complexos como a celulose, hemicelulose e pectina (JUHÁSZ et al. 2005), que juntamente com outras estruturas tais como proteínas e lignina, formam um complexo molecular extremamente rígido. Seu polissacarídeo predominante é a celulose, seguido de hemicelulose, que normalmente formam ligações de hidrogênio com o primeiro, assim como com outras hemiceluloses, ajudando a estabilização da matriz da parede celular e tornando-a insolúvel em água (HIMMEL et al. 1999). A Figura 2 mostra esquematicamente como está estruturada a parede celular vegetal.

Figura 2 - Modelo esquemático da parede celular vegetal. A parede celular consiste de microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz de hemiceluloses, glicanas e pectina. Também fazem parte da parede celular estrutura protéicas e lignina, estrutura polimérica complexa constituída de unidades de fenilpropanóides, encontrada na lamela média (Figura extraída e adaptada do site micro.magnet.fsu.edu, Florida State University website, texto da legenda baseado em CARPITA; GIBEAUT, 1993).

A **celulose** consiste em um polímero de unidades de D-glicose conectadas através de ligações β -1,4. Na celulose cristalina, essas cadeias poliméricas estão unidas por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura altamente insolúvel. A Figura 3 mostra a formação da molécula da celulose via a eliminação da água (ROSA; GARCIA, 2009).

Figura 3 - A estrutura molecular da celulose. (Figura extraída de: MORAIS, et al., 2005).

As **hemiceluloses** possuem uma composição extremamente heterogênea de diversas unidades de açúcares interconectados. As hemiceluloses são usualmente classificadas de acordo com a cadeia principal que compõe o polímero sendo elas a arabinoxilana, acetilglucuronoxilana, xilana, xiloglucana, arabinana, arabinogalactana, galactomanano, glucomanano e galactoglucomanano (ROSA; GARCIA, 2009; POLIZELI et al., 2011). As três cadeias dos grupos correspondentes de hemiceluloses são hidrolisadas por um conjunto específico de enzimas ativas de carboidratos. Por exemplo, a principal hemicelulose, xilana, consiste de unidades de D-xilose β -1,4 ligadas e é degradada pelas enzimas β -1,4-endoxilanase e β -1,4-xilosidades, entre outras (POLIZELI et al, 2011). A Figura 4 mostra a estrutura molecular da xilana.

Figura 4 - A estrutura molecular da xilana. (Figura extraída de: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>).

As **pectinas** fazem parte de uma família de polissacarídeos complexos contendo como cadeia principal ácido D-galacturônico α -1,4 ligados. As pectinas contêm duas regiões distintas em sua estrutura molecular, uma contendo resíduos de ácido D-galacturônico que podem ser metilados ou acetilados e outra composta de duas estruturas diferentes, D-xilose substituída com galacturonanas ou ramnogalacturonanas. A Figura 5 mostra a estrutura molecular da pectina.

Figura 5 - Estrutura molecular da pectina. (Figura extraída de: <http://www.food-info.net/pt/qa/qa-wi6.htm>)

A parede celulósica dos vegetais é enrijecida pela **lignina**, um complexo altamente insolúvel com substituições de fenilpropanos interconectados por ligações carbono-carbono. A Figura 6 mostra a estrutura molecular da lignina.

Figura 6 - Estrutura molecular da lignina. (Figura extraída de ALBINANTE, et al., 2012).

O estudo das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal tem sido intensa desde os anos 1950 (REESE, 1976; COUGHLAN, 1985; MANDELS, 1985). A degradação de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos tem grande importância, uma vez que os açúcares fermentáveis

podem ser utilizados como matérias-primas em inúmeros processos de produção biotecnológica, incluindo, como já foi dito, a produção de etanol (LAWFORD; ROUSSEAU, 2003).

Na natureza, os fungos apresentam um papel central na degradação da biomassa de plantas produzindo um conjunto extensivo de enzimas que degradam carboidratos as quais são especificamente dedicadas a degradar polissacarídeos de plantas. Entretanto, esses diferentes conjuntos diferem entre as espécies de fungos. Por exemplo, *T. reesei* apresenta um conjunto de enzimas altamente eficientes na degradação da celulose (MARTINEZ et al., 2008; KUBICECK et al., 2011) enquanto que outras espécies de *Aspergillus* produzem muitas enzimas para degradar pectina (MARTENS-UZUNOVA; SCHAAP, 2009).

As enzimas ativas de carboidratos (do inglês, CAZy), que são as enzimas que degradam a biomassa, podem ser organizadas em diferentes famílias baseadas na sua sequência de aminoácidos dos módulos catalíticos estruturalmente relacionados (www.cazy.org) (CANTAREL et al., 2009; HENRISSAT, 1991). As enzimas fúngicas envolvidas na degradação de polissacarídeos de plantas estão organizadas em pelo menos 35 famílias de glicosil-hidrolases (GH), três famílias de carboidrato-esterases (CE) e seis famílias de pectinas liases (PL) (BATAGLIA et al., 2011; COUTINHO et al., 2009). Apesar das enzimas dentro de uma mesma família dividirem similaridades em suas sequências, algumas podem conter múltiplas atividades. Por exemplo, a família GH5 apresenta muitas atividades catalíticas, incluindo exoglucanases, endoglucanases e endomananases (DIAS et al., 2004). Além disso, uma enzima de atividade específica pode estar presente em muitas famílias CAZy. Isto é importante para a degradação eficiente dos polissacarídeos das plantas, pois as enzimas de cada família têm especificidade de substrato muitas vezes complementares. A anotação das enzimas ativas de carboidratos tem sido feita para muitos genomas de fungos, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *T. reesei* e *S. cerevisiae* (PEL et al., 2007; ESPAGNE et al., 2008; BATAGLIA et al., 2011; OHM et al., 2010; MARTINEZ et al., 2004; MARTINEZ et al., 2008).

A degradação dos compostos da parede celular vegetal é um processo complexo que envolve sinergismo entre uma variedade de sistemas enzimáticos. A celulose ocorre em regiões cristalinas e não cristalinas bem como em associação com deposição de lignina na parede secundária. Microfibrilas de celulose são conhecidas por serem particularmente recalcitrante à sacarificação onde ocorrem na

configuração cristalina ou na presença de lignina (CHEN e DIXON, 2007). A completa hidrólise de celulose a glicose, por exemplo, requer a ação de três classes de enzimas. As endoglucanases (EGL) (1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase) que hidrolisam cadeias internas da celulose, principalmente aquelas da região amorfa, fornecendo assim maior número de unidades a serem clivadas pelas celobiohidrolases. As exoglucanases/celobiohidrolases (CBH) que clivam unidades de celobiose a partir das extremidades do polissacarídeo e a β -glicosidase que cliva celobiose a glicose, que serve como fonte de carbono prontamente metabolizável para os fungos (BEGUIN, 1990; ARO et al., 2005; TEERI, 1997). As três enzimas atuam sinergisticamente na decomposição da biomassa e em uma sequência de eventos.

As celulases são preferencialmente produzidas a partir de fungos basidiomicetos decompositores de madeira como *Phanerochaete chrysosporium* (IGARASHI et al. 2008), *Trametes versicolor* (LAHJOUJI et al. 2007), *T. hirsute* (NOZAKI et al. 2007), *Ceriporiopsis subvermispota* (MAGALHÃES et al. 2006), *Agaricus bisporus* (DE GROOT et al. 1998), *Volvariella volvacea* (DING et al. 2006) e *Schizophyllum commune* (HENRISSAT et al. 1989). No entanto, como relatado por HENRISSAT et al (1989), as bactérias *Clostridium thermocellum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Bacillus* sp., *Cellulomonas fimi*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Cryptococcus albidus* produzem também celulases em níveis elevados. Fungos filamentosos como *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*) (SCHMOLL; KUBICECK 2003) e em menor extensão *Aspergillus* sp (DEDAVID; SILVA et al. 2009) e *Penicillium* (CAMASSOLA; DILLON 2007) também são relatados como produtores de celulase. A Figura 7 apresenta a estrutura esquemática da celulose com a atuação das enzimas β -glicosidase (BGL), a enzima celobiohidrolase (CBH) e a enzima β -1,4-endoglucanase.

Figura 7 - Estrutura esquemática da celulose com as enzimas β -glicosidase (BGL) celobiohidrolase (CBH) e a enzima β -1,4-endoglucanase (EGL). (Figura extraída de DE VRIES et al., 2011).

Essas três classes de enzimas estão divididas em oito famílias GH (VLASENKO et al., 2010; DE VRIES et al., 2011). *A. niger*, por exemplo, possui cinco EGLs dentro das famílias GH5 e 12, quatro CBHs nas famílias 6 e 7 e treze BGLs nas famílias 1 e 3. Em comparação, o fungo mais eficiente de degradação da celulose, o *T. reesei*, possui cinco EGLs caracterizadas dentro das famílias 5, 7, 12 e 45, duas CBHs altamente expressas nas famílias 6 e 7 e duas BGLs caracterizadas nas famílias 1 e 3 (MARTINEZ et al., 2008; KUBICECK et al., 2011). Embora *T. reesei* não tenha o maior número de celulasas, seu conjunto de enzimas é muito eficiente na quebra de celulose atuando através de sinergismo. Devido à estrutura heterogênea das hemiceluloses, a sua degradação completa requer um sistema enzimático com várias enzimas agindo sobre a cadeia principal ou lateral, devido à presença de grupos substitutos. A hidrólise da hemicelulose ocorre por meio da ação sinérgica de endo-enzimas responsáveis pela clivagem interna da cadeia principal, além de exo-enzimas que liberam açúcares monoméricos e outras enzimas que hidrolisam as cadeias laterais de polímeros ou oligossacarídeos, liberando assim diversos mono- ou dissacarídeos dependendo do tipo de hemicelulose clivada. Por exemplo, a degradação de xilana envolve pelo menos as enzimas endo-1,4- β -D-xilanases e β -xilosidases atuando na cadeia principal e, dependendo do tipo de xilana, requer também a ação de α -glucuronidase e acetil xilana esterase, para a clivagem das cadeias laterais. A degradação da xiloglucana requer a atuação das enzimas β -1,4-endoglucanase e β -1,4-glicosidase e a degradação da galactomanana requer a atuação das enzimas β -1,4-endomanase e β -1,4-manosidase (DE VRIES; VISSER, 2001).

A β -1,4-xilosidase de fungos pertence às famílias GH10 e 11 (POLIZELI et al., 2005). Os dois grupos de endoxilanases diferem um do outro na especificidade do substrato (BIELY et al., 1997). A família GH10 apresenta uma especificidade mais ampla de substratos do que as endoxilanases da família GH11. Os xilo-oligossacarídeos são degradados pela β -xilosidase. Muitas β -xilosidases fúngicas pertencem à família GH3 (MOZOLOWSKI; CONNERTON, 2009), mas muitas β -xilosidases putativas são atribuídas à família GH43, como por exemplo, em *Penicillium herquei* e *A. oryzae* (ITO et al., 2003; MACHIDA et al., 2005). A xiloglucanase, pertence às famílias GH12 e 74 (GRISHUTIN et al., 2004). A principal diferença entre as enzimas das famílias GH12 e 74 são seus mecanismos de retenção e inversão, respectivamente (GILBERT et al., 2008). As endomananases, envolvidas na degradação dos

polissacarídeos mananas, pertencem às famílias GH5 e 26. Entretanto, as endomananases fúngicas são predominantemente presentes na família GH5. As endomananases GH5 de *A. niger* e *T. reesei* apresentam especificidade de substrato para mano-oligossacarídeos com mais de três resíduos e d-manose (TENKANEN et al., 1997; DO et al., 2009). Como muitas outras enzimas de carboidratos ativas, algumas endomananases possuem um módulo de ligação ao carboidrato (chamado CBM1) o qual promove a associação da enzima com o substrato (HERVE et al., 2010; PHAM et al., 2010; BORASTON et al., 2004). A liberação da manobiose e manotriose é realizada ainda pela enzima β -1,4-manosidase pertencente à família GH2 (ADEMARK et al., 2001). Para a completa degradação da hemicelulose, todas as suas ramificações necessitam ser degradadas. Isso requer pelo menos nove diferentes enzimas divididas ao longo de pelo menos doze famílias GH e quatro famílias CE. As ramificações encontradas geralmente são compostas por L-arabinose, D-xilose, L-fucose, D-galactose, ácido D-glucurônico, resíduos acetil e os ácidos p-cumárico e ferúlico.

Visando aplicações biotecnológicas, a fonte ideal de xilanase seria aquela que produz uma quantidade adequada de cada uma das enzimas que compõem o sistema xilanolítico. As interações sinérgicas entre as enzimas que degradam xilana aumentariam a susceptibilidade desta ao ataque de endoxilanases. Entre as fontes microbianas, os fungos filamentosos são especialmente interessantes uma vez que secretam as enzimas para o meio, e os seus níveis de xilanase são mais elevados do que aqueles em leveduras e bactérias (POLIZELI, et al., 2011). A clonagem, sequenciamento e a expressão de genes de xilanases de microrganismos de diferentes gêneros têm sido realizados em *E. coli* (KULKARNI et al., 1999b, LIU et al., 1999). As xilanases de bactérias são restritas às frações intracelulares ou periplasmática (SCHLACHER et al., 1996), embora a atividade extracelular tenha também sido relatada (KARISSON et al., 1998; EBANKS et al., 2000). Além disso, as enzimas expressas em bactérias não são sujeitas a modificações pós-traducionais, tais como glicosilação. Além das bactérias, as xilanases foram também expressas na levedura *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris*. *S. cerevisiae* é um hospedeiro atraente para a expressão de xilanases heterólogas (ROMANOS et al., 1992). Ele fornece processamentos pós-traducionais eficientes tais como glicosilação, dobramento correto das proteínas e proteólise (SA-PEREIRA et al., 2003). Apesar de ser um hospedeiro que secreta apenas algumas proteínas, as proteínas expressas em *S. cerevisiae* são mais facilmente purificadas (DAS; SHULTZ, 1987). Por outro lado, a expressão heteróloga de

genes em *P. pastoris* é uma alternativa útil para a intensificação do processo industrial e tem várias vantagens sobre a levedura *S. cerevisiae* devido à alta eficiência de secreção, altas densidades celulares obtidas em meio de cultura de baixo custo, e a relativa facilidade de intensificação do processo industrial (CREGG, 1999). Trata-se de um hospedeiro de expressão particularmente atrativo, devido à disponibilidade de promotores fortes e regulatórios que estão envolvidos no metabolismo do metanol (TSAI; HUANGA, 2008).

Fungos filamentosos são hospedeiros atrativos para a expressão de proteínas devido à sua capacidade natural para secretar grandes quantidades de proteínas para o meio. Fungos que dominam o mercado como hospedeiros de expressão são *A. niger* (LEVASSEUR et al., 2005), *A. nidulans* (PEREZ-GONZALEZ et al., 1998), *A. oryzae* (KIMURA et al., 2002), e *T. reesei* (MANTILA et al., 2007). A maioria dos genes de xilanase foram expressos em fungos em sistemas homólogos.

A degradação das ramificações da pectina requer duas classes de enzimas: glicosídeo hidrolases e polissacarídeo liases. A Figura 8 apresenta uma estrutura esquemática de três pectinas com suas enzimas pectinolíticas.

Figura 8 - Estrutura esquemática das pectinas ramnogalacturona I, homogalacturona e xilogalacturona com suas enzimas pectinolíticas. (Figura extraída de De vries; Brink, 2011).

A grande parte das glicosídeo hidrolases fúngicas envolvidas na degradação da ramificação da pectina são pertencentes à família GH28 (MARTENS-UZUNOVA; SCHAAP, 2009). Essas enzimas podem ser divididas em grupos de acordo com a região específica em que elas atuam: endo e exo-poligalacturonase (GH28) clivam a ramificação de regiões lisas, enquanto que mais intrínseco, as regiões rugosas são atacadas pelas enzimas endo e exo-ramnogalacturonase (GH28), xilogalacturonase (GH28), α -raminosidases (GH78), glicoronil hidrolases insaturada (GH88) e ramnogalacturona hidrolases insaturadas (GH105). Endo e exo-poligalacturonases da família GH28 em geral clivam as ligações α -1,4-glicosídicas entre os ácidos α -galacturônico. O genoma de *A. niger* apresenta sete endopoligalacturonases, cada qual exibindo propriedades cinéticas distintas (MARTENS-UZUNOVA; SCHAAP 2009; BENEN et al., 2000; BUSSINK et al., 1991; PARENICOVA et al. 1998, 2000a). O genoma de *A. niger* apresenta também quatro potenciais exopoligalacturonases: PgaX, PgxA, PgxB e PgxC (MARTENS-UZUNOVA et al., 2006), cada uma delas tendo preferência por clivar substratos diferentes.

Outro importante grupo da família GH28 são as hidrolases ramnogalacturona, as quais estão empregadas tanto em mecanismos endo e exolítico para clivagem das pontes α -1,2-glicosídico formadas entre o ácido D-galacturônico e resíduos de L-raminose nas regiões rugosas (KODOF et al., 1994; SUYKERBUYK et al., 1995). *A. niger* apresenta duas endoraminogalacturonases caracterizadas (RhgA e RhgB) e quatro putativas (MARTENS-UZUNOVA; SCHAAP, 2009; SUYKERBUYK et al., 1997). Exoraminogalacturonases retiram resíduos de ácido D-galacturônico da ponta não reduzida de cadeias de ramnogalacturonas, mas não atuam em homogalacturonas (MUTTER et al., 1998). A análise da sequência do genoma de *A. niger* indicou a presença de três genes RgxA, RgxB e RgxC, codificando exoraminogalacturonases putativas (MARTENS-UZUNOVA et al., 2006). A hidrólise da cadeia de pectina também requer enzimas de outras famílias GH como α -raminosidases (GH78), hidrolases glicoronil insaturadas (GH88) e hidrolases ramnogalacturona insaturadas (GH105).

Pectina e pectato liases clivam, via o mecanismo de β -eliminação, a ligação α -1,4 dos resíduos de ácido galacturônico dentro das regiões lisas da pectina (LOMBARD et al., 2010). Atualmente, todas as pectinas liases pertencem à família PL1, PL3 e PL9. Em *A. niger*, seis pectina liases e somente uma pectato liase foram identificadas e parcialmente caracterizadas (BENEN et al., 2000; HARMSSEN et al.,

1990; GYSLER et al., 1990). Em contraste, *A. nidulans* apresenta somente duas pectina liases (GALAGAN et al., 2005; BAUER et al., 2006), sugerindo significantes diferenças entre esses fungos (COUTINHO et al., 2009). Raminogalacturona liases diferem substancialmente em suas estruturas das enzimas pectina e pectato liases e clivam dentro das regiões rugosas da pectina. Esse grupo de liases pertence à duas famílias, PL4 e PL11, onde PL4 apresenta um pH ótimo muito menor que as liases da família PL11 (JENSEN et al., 2010).

As estruturas xilogalacturona e raminogalacturona também requerem enzimas acessórias para remover as cadeias laterais e promover o acesso para as enzimas pectinolíticas que hidrolisam a cadeia principal. Algumas delas como α -arabinofuranosidases (GH51 e GH54), β -galactosidase (GH2 e GH35) e β -xilosidases (GH3 e GH43) também são necessárias para degradação da hemicelulose, enquanto que endoarabinases (GH43), exoarabinases (GH93), β -endogalacanases (GH53) e muitas esterases (CE8, CE12 e CE13) são específicas para degradação da pectina (MARTENS-UZUNOVA; SCHAAP, 2009).

A celulose e a hemicelulose que compõem a parede celular vegetal são rodeadas por uma matriz de lignina. A degradação de lignina é indispensável para a hidrólise de celulose e de hemiceluloses e conseqüentemente para a utilização das principais fontes de carbono pelos fungos. Entretanto, devido à hidrofobicidade e a natureza complexa da estrutura da lignina, este composto não é facilmente degradado por microorganismos. As enzimas responsáveis pela degradação de lignina são oxidativas, não-específicas e atuam através de mediadores não-protéicos, em contraste com as enzimas hidrolíticas do sistema celulolítico e hemicelulolítico (ARO et al., 2005). As principais enzimas lignolíticas de fungos filamentosos são a manganês peroxidase e lignina peroxidases, que catalisam uma variedade de reações oxidativas dependentes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como as lacases, que oxidam compostos fenólicos e reduzem oxigênio molecular à água. Adicionalmente, enzimas extracelulares capazes de gerar H_2O_2 , tais como a glioxal oxidase e a glucose-2-oxidase, que geram peróxidos essenciais para a função das peroxidases, também desempenham atividade no processo de deslignificação. A Figura 9 mostra um esquema da ação sinérgica de celulasas (Fig 9a) e hemicelulasas (Fig 9b) na degradação da lignocelulose.

Figura 9 - Sistemas enzimáticos de degradação da celulose e hemicelulose. (a) Sistemas celulolíticos, onde os sítios de maiores atividades de enzimas celulolíticas são representados. (b) Sistema hemicelulolítico, tomando como exemplo a degradação de arabinoxilana. As enzimas ativas nos substratos estão descritas na tabela (Figura extraída de ARO et al., 2005).

1.3 A regulação das enzimas hidrolíticas em fungos filamentosos

Como a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares em grande quantidade é um processo que demanda alto custo energético, a regulação dos genes que codificam estas enzimas, dependente da fonte de carbono, é restrita, sendo que a produção das enzimas ocorre em condições em que o fungo realmente necessita utilizar os polímeros de plantas como fonte energética. Como consequência, o processo para a degradação dos polímeros da parede celular vegetal, bem como sua produção, é estritamente regulado.

Existe um considerável nível de regulação cruzada durante a indução da expressão de genes que codificam diferentes classes de enzimas hidrolíticas. Os mesmos compostos podem provocar a expressão tanto de celulasas quanto de

hemicelulases, em extensão diferente (MARGOLLES-CLARK et al., 1997). A maioria dos genes estudados até ao momento são reprimidos por fontes de carbono prontamente metabolizáveis tais como a glicose, sendo induzidos na presença de substratos poliméricos. Entretanto, como tais polímeros não são capazes de penetrar nas células, devido ao seu tamanho, é esperado que as moléculas indutoras de fato sejam produtos hidrolisados dos polímeros ou de seus derivados. A regulação dos genes responsáveis pela codificação de enzimas hidrolíticas é realizada por elementos encontrados nos promotores desses genes, responsáveis pela ligação de fatores de transcrição regulatórios ainda não muito bem estudados em fungos, tais como o fator de transcrição XlnR.

1.4 O fator de transcrição XlnR de *A. niger*

O fator de transcrição *xlnR* de *A. niger* é um regulador metabólico importante, ativando enzimas do sistema xilanolítico, várias endocelulases e duas celobiohidrolases, não ativando porém a β -glucosidase (STRICKER et al., 2008). O fator de transcrição *xlnR* foi clonado por complementação de um mutante de *A. niger* deficiente na atividade xilanolítica (mutantes NXA, VAN PEIJ et al., 1998). O gene *xlnR* codifica um polipeptídeo de 875 aminoácidos, sendo que XlnR pertence à classe das proteínas que contém um domínio binuclear de zinco (PF00172), tal como GAL4 (Finn et al., 2006). Na região C-terminal do domínio de ligação ao DNA de XlnR podem ser encontrados grupamentos de aminoácidos básicos tais como arginina e lisina, que aparentemente estão envolvidos na localização nuclear. A região mencionada anteriormente é similar a uma região de GAL4 que está envolvida na homodimerização, sendo conectada com o domínio de ligação ao DNA através de um “linker” (MARMORSTEIN et al., 1992).

Outra região em XlnR forma uma α -hélice anfipática, direcionando a extremidade C-terminal a partir da última cisteína da região de ligação ao DNA. Um segundo domínio representado por 4 repetições helicoidais parece estar presente na extremidade C-terminal de XlnR. O grupamento bi-nuclear de zinco, localizado na região de ligação ao DNA, é encontrado na porção N-terminal da proteína (aminoácidos 49-91). Uma outra região de ligação ao DNA, um domínio específico de fator de transcrição de fungos (PFP04082), é encontrada nas posições de 481 a 576. Este domínio parece estar envolvido em processos metabólicos, embora sua

função específica não seja ainda conhecida (MACPHERSON et al., 2006). O domínio bi-nuclear de zinco de ligação ao DNA liga-se à sequência 5'-GGCTAA-3', encontrada em regiões regulatórias de todos os genes xilanolíticos e celulolíticos de *A. niger*, exceto àqueles que codificam β -glucosidases (STRICKER et al., 2008). A representação esquemática de XlnR está demonstrada na Figura 10. Alguns dos genes codificadores de galactosidases também demonstraram estar sob o controle de XlnR (DE VRIES et al., 1999a). Análise de microarranjos de linhagens de *A. niger* apresentando *xlnR* nativo e *xlnR* nocauteado mostrou que cerca de 25 genes são positivamente regulados por XlnR (STRICKER et al., 2008). A maioria das enzimas codificadas por estes genes está envolvida na modificação e hidrólise de arabinoxilanas e glicanas.

Através do sequenciamento do alelo de *xlnR* de três mutações NXA (mutações de perda de função), foi identificada uma mutação pontual em um dos mutantes, onde uma leucina foi substituída por uma prolina (posição 650), capaz de perturbar a estrutura helicoidal e as interações hidrofóbicas do segundo possível domínio helicoidal em XlnR. Tal domínio pode estar envolvido em interações proteína-proteína. As outras duas mutações foram identificadas na região C-terminal da XlnR (leucina por serina na posição 823 e tirosina por ácido aspártico em 864). A última destas mutações mencionadas está localizada a 12 aminoácidos da extremidade C-terminal, sendo possivelmente a região de ativação da XlnR (VAN PEIJ et al., 1998). Baseado nos estudos realizados por van Peij et al. (1998), fusões das proteínas XlnR mutadas com GFP (green fluorescent protein) foram construídas (HASPER et al., 2004). Estudos com estas proteínas demonstraram que a deleção da região que forma a α -hélice leva à localização citoplasmática de XlnR e consequentemente a perda da transcrição de genes codificadores de enzimas hidrolíticas. HASPER et al. (2004) também demonstraram que a extremidade C-terminal da XlnR está envolvida na regulação transcripcional. A deleção de 78 aminoácidos nesta região levou ao aumento da expressão de genes alvos de XlnR, mesmo sob condições repressoras (repressão por D-glicose, por exemplo), sugerindo que tal região possa ser o domínio de modulação de XlnR.

Figura 10 - Representação esquemática dos domínios funcionais de XlnR de *A. niger*. A proteína está orientada da extensão N-terminal (esquerda) para C-terminal (direita). O grupamento binuclear de Zn da região de ligação ao DNA é localizado na extensão N-terminal. O domínio helicoidal central parece estar envolvido na localização nuclear. A região C-terminal deste domínio pode estar relacionada com a regulação da atividade da XlnR, contendo um domínio de inibição pela D-glicose e um domínio de ativação (modificado de STRICKER et al., 2008).

1.4.1 Reguladores transcricionais em outros sistemas fungicos

O gene *xlnR* de *Aspergillus oryzae* (AoxlnR), um homólogo do gene *xlnR* de *A. niger*, foi isolado como um ativador da transcrição do gene da maior xilanase, *xynF1*, em *Aspergillus oryzae*. AoXlnR controla a expressão de pelo menos quatro genes xilanolíticos e quatro genes de celulases, quando induzidos por xilana e D-xilose. Além disso, foi observado que AoxlnR também controla a expressão dos genes xilanolíticos, bem como os genes de celulases quando em presença de celulose (MARUI et al., 2002).

Os fatores de transcrição, Acel e Acell também foram isolados em *T. reesei* (SALOHEIMO et al., 2000; ARO et al., 2001). Acell está envolvido na expressão de genes de celulase e xilanase induzidos por celulose (ARO et al., 2001). No entanto, XlnR e Acell são diferentes em tamanho e não mostram similaridade na sequência de aminoácidos, o que indica que o mecanismo de indução dos genes celulolíticos e xilanolíticos em *T. reesei* pode ser diferente dos de *Aspergilli* (MARUI et al., 2002).

O fator de transcrição ortólogo de *Aspergillus sp* também foi isolado no patógeno de plantas *Fusarium oxysporum*. A transcrição do gene *xlnR* neste organismo foi ativada através da indução de fontes de carbono, tais como xilana e reprimido por glicose. O nocaute de *xlnR* em *F. oxysporum* resultou na ausência de transcrição dos genes de xilanase estruturais, tanto em cultura e durante a infecção

de plantas de tomate, assim como na atividade de xilanase extracelular dramaticamente reduzida. Em contraste, a expressão de *xlnR* sob o controle do promotor *gpdA* de *A. nidulans* não aumentou significativamente a atividade de xilanase, indicando que *xlnR* é regulado não só na transcrição, mas também ao nível pós-traducional (CALERO-NIETO, et al., 2007).

Em *N. crassa* um “screening” de uma coleção de fatores de transcrição identificou dois fatores de transcrição que contêm um domínio nuclear de zinco (*crl-1* e *crl-2*) e que são necessários para o crescimento e atividade enzimática em celulose, mas não são necessários para o crescimento ou atividade enzimática em xilana. Os fatores de transcrição *crl-1* e *crl-2* são necessários para a indução de genes que codificam todas as principais celulasas e algumas das principais hemicelulasas. A proteína CRL-1 funcional é necessária para a expressão de *crl-2* e a utilização eficiente de celobiose (CORADETTI et al., 2012).

Homólogos de *crl-1* e *crl-2* encontram-se presentes no genoma de uma variedade de fungos ascomicetos capazes de degradar material da parede celular de plantas. Em *A. nidulans* o homólogo de *crl-2* (*crl-B*) é necessário para a atividade celulolítica, já o homólogo de *crl-1* (*crl-A*) modula a expressão de genes que codificam celulasas (CORADETTI et al., 2012).

O estudo de reguladores transcricionais envolvidos na ativação de genes que codificam para as enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de celulose e hemicelulose poderia resultar no melhoramento genético de microrganismos que degradam a biomassa vegetal.

1.5 A repressão de carbono em fungos filamentosos

Os carboidratos prontamente metabolizáveis, tais como glicose, reprimem a síntese de celulasas e hemicelulasas responsáveis pela degradação de diversos polissacarídeos, determinando a utilização da fonte preferencial de carbono. Para as células tal repressão é benéfica porque a fonte de carbono mais favorável energeticamente é assim utilizada e nenhuma energia extra é desperdiçada na síntese de outros sistemas catabólicos. Este fenômeno é usualmente denominado repressão de catabólitos de carbono ou simplesmente repressão de carbono (RONNE et al., 1995; RUIJTER; VISSER, 1997). A repressão pode ser produzida por diversas fontes de carbono, porém a glicose é provavelmente a molécula com maior

atividade repressora (RUIJTER; VISSER, 1997). Assim sendo, a repressão por glicose é um caso específico do fenômeno de repressão de carbono.

Existem basicamente três grupos de sistemas metabólicos que podem estar sujeitos à repressão de carbono. O primeiro e principal grupo compreende genes que codificam enzimas relacionadas ao catabolismo de fontes de carbono menos favorecidas energeticamente, como por exemplo celulases e hemicelulases. A Tabela 1 mostra os principais sistemas catabólicos sujeitos à repressão de carbono em *Aspergilli* (revisão em RUIJTER; VISSER, 1997). Uma grande parte de sistemas enzimáticos envolvidos na degradação de polissacarídeos, tais como pectinas, celulose e xilana são reprimidos por glicose.

Tabela 1 - Sistemas catabólicos sujeitos à repressão de carbono em *Aspergilli*

Substrato	Enzima
Pectina	Pectato liase
Celulose	β -glucosidase
Xilana	Endo-xilanase
	β -xilosidase
Arabinana	Arabinofuranosidases A e B
L-arabinose	L-arabinose redutase, L-arabitol desidrogenase
Proteína	Proteases extracelulares PEPA, PEPB e PEPF
Glicerol	Glicerol quinase, glicerol-3-fosfato desidrogenase
Etanol	Álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, ALCR
Prolina	Prolina permease, prolina oxidase

O segundo grupo inclui genes que codificam enzimas relacionadas à gliconeogênese e ao ciclo do glioxalato, embora esse sistema tenha sido pouco estudado em *Aspergilli*. Finalmente, o terceiro grupo de genes sujeitos à repressão de carbono está envolvido no metabolismo secundário, sendo que a produção de penicilina é o sistema mais bem caracterizado deste grupo (ESPESO et al., 1992; 1993). Do ponto de vista fisiológico, a repressão de carbono durante o metabolismo secundário pode estar relacionada à competição por fontes de carbono. A produção

de um antibiótico, por exemplo, só se faria necessária em condições onde fontes de carbono estão limitadas.

1.5.1 A proteína repressora CreA

A principal proteína reguladora dos genes envolvidos na repressão de carbono em *Aspergillus* é a CreA (revisão em RUIJTER; VISSER, 1997). É interessante mencionar que CreA foi a única proteína regulatória encontrada até o momento durante mediação da repressão de carbono em *Aspergilli*. Atualmente, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos durante a repressão de catabólitos de carbono por CreA. A proteína possui duas estruturas do tipo “Zn-finger” muito similares à estrutura de MIG1, uma proteína da via repressora de glicose em *S. cerevisiae* (NEHLIN; RONNE, 1990).

O gene *creA* de *A. niger* foi isolado a partir de hibridização cruzada, utilizando-se o gene clonado de *A. nidulans*. O gene de *A. niger* é funcional em *A. nidulans*, como demonstrado por complementação heteróloga da mutação do gene *creA204* de *A. nidulans*. De modo geral, os genes apresentam 90% de similaridade em sequência (82% de identidade) de aminoácidos. Em *A. niger*, a repressão de catabólitos de carbono é mediada por CreA (DOWZER; KELLY, 1991; DRYSDALE *et al.*, 1993). Mutantes de *A. niger* com a repressão de carbono diminuída foram isolados a partir de uma linhagem parental de *creA* através da seleção de colônias que exibiram crescimento acelerado na presença de ácido 4-aminobutanóico (GABA) e D-glicose (RUIJTER *et al.*, 1997). Uma diminuição da expressão dos genes *faeA* (codifica para feruloil esterase), *aguA* (α -glicuronidase), *xlnB* (endoxilanase) e *xlnD* (β -xilosidase) de *A. niger* em xilose foi observada na linhagem nativa em concentrações crescentes de glicose (DE VRIES *et al.*, 1999a). Entretanto, os níveis de expressão destes genes em mutantes CreA não foram alterados. Os resultados para a linhagem nativa demonstraram que concentrações de xilose maiores que 1 mM resultaram na repressão da expressão de genes xilanólitos testados mediante a proteína repressora de catabólitos de carbono CreA.

Assim, em xilose, os níveis de expressão dos genes xilanólitos não foram determinados somente por indução via XlnR, mas também por repressão via CreA. Os genes testados não foram influenciados na mesma extensão por XlnR ou CreA,

resultando em níveis e padrões de expressão específicos para cada gene. Os vários alelos de *creA* de *A. nidulans* demonstraram heterogeneidade não-hierárquica, ou seja, eles não são apenas diferentes na extensão em que causam repressão de um alvo específico em determinado sistema, mas também variam com diferentes alvos de diferentes sistemas (RUIJTER; VISSER, 1997). A deleção de *creA* em *A. nidulans* parece ser letal (DOWZER; KELLY, 1991). Já foi demonstrado que CreA é uma proteína repressora, ligando-se a sequências curtas específicas nas regiões promotoras dos sistemas alvo, sendo que tal ligação previne a transcrição destes genes (RUIJTER; VISSER, 1997). Tal fato foi demonstrado para os sistemas *alc* e *prn* de *A. nidulans*, envolvidos no catabolismo do etanol e da prolina, respectivamente (KULMBURG et al., 1993; MATHIEU; FELENBOCK, 1994; CUBERO; SCAZZOCCHIO, 1994). Entretanto, foi demonstrado que para o caso do regulon de etanol, CreA opera em dois níveis (KULMBURG et al., 1993; MATHIEU; FELENBOCK, 1994). CreA reprime tanto *alcR* (ativador de transcrição de genes *alc*) e os genes estruturais *alcA* (codifica para álcool desidrogenase I) e *aldA* (aldeído desidrogenase). Quando os sítios de ligação para CreA dos promotores de *alcR* foram deletados ou substituídos por um promotor constitutivo, *alcA* foi apenas parcialmente de-reprimido, indicando que CreA também reprime *alcA* diretamente (MATHIEU; FELENBOCK, 1994). Em mutantes *creA30*, *alcR*, *alcA* e *aldA* tiveram sua repressão abolida quase completamente. Assim, no catabolismo do etanol parece existir um mecanismo que opera com CreA reprimindo tanto *alcR*, prevenindo assim o estímulo da transcrição de genes estruturais *alc*, bem como os genes *alcA* e *aldA* propriamente ditos (RUIJTER; VISSER, 1997).

A expressão de *xlnR* não é suficiente para a indução de genes codificadores do complexo xilanolítico, sendo que a presença de xilose é absolutamente necessária (TAMAYO et al., 2008). Foi estabelecido previamente que CreA reprime indiretamente os genes *xlnA* [codifica X(22)] e *xlnB* [codifica X(24)], assim como exerce repressão direta sobre *xlnA* (OREJAS et al., 1999, 2001). TAMAYO et al. (2008) demonstraram as seguintes evidências de que a repressão indireta mediada por CreA ocorre através da repressão de *xlnR* de *A. nidulans*: (i) o promotor do gene *xlnR* sofre repressão por glicose e tal repressão é abolida em linhagens mutantes *creA(d)30* e (ii) a expressão não regulada de *xlnR* aboliu a repressão por glicose de *xlnA* e *xlnB*. Assim, é possível que CreA e *XlnR* formem uma cascata transcricional que regula os genes xilanolíticos de *A. nidulans*.

1.6 O fungo *A. nidulans* como modelo experimental

O gênero *Aspergillus* faz parte da classe dos Ascomicetos, pertencente ao reino Fungi, e consiste de um grupo de espécies bem caracterizadas. Nesse gênero, encontra-se *A. nidulans*, um fungo saprófito que pode ser isolado do solo ou ocorrer como bolor em alimentos. As condições naturais de crescimento desse fungo filamentoso demonstram que ele tem a capacidade de utilizar uma grande variedade de substratos como fonte nutricional e de crescer em uma ampla faixa de temperatura. Essas características facilitam o seu cultivo em laboratório, que é realizado em meios de cultura simples, contendo várias fontes de nitrogênio e glicose como principal fonte de carbono.

Há algum tempo, a espécie *A. nidulans* vem sendo utilizada como micro-organismo modelo para a pesquisa genética clássica e mais recentemente para estudos moleculares. Como a assimilação de nutrientes requer diversas vias bioquímicas e a produção de enzimas participantes dessas vias sofre regulação gênica, os geneticistas e bioquímicos iniciaram o estudo deste organismo a partir da década de 50 (WARD, 1991). A introdução dessa espécie como um organismo modelo iniciou-se a partir de estudos pioneiros de Guido Pontecorvo e Etta Kafer que tornaram possível a utilização desse fungo como um modelo, principalmente no campo da genética (PONTECORVO et al., 1953; KAFFER, 1977). Posteriormente, os estudos igualmente importantes de Ronald Morris na caracterização do processo de mitose nesse fungo e o isolamento de mutantes condicionais permitiram um aprimorado estudo do ciclo celular e da maquinaria morfogenética nesse micro-organismo (GOLDMAN; KAFFER, 2004; OSMANI; MIRABITO, 2004).

O sequenciamento de *A. nidulans* revelou que esse fungo possui um genoma relativamente pequeno organizado em oito cromossomos geneticamente bem caracterizados, possuindo um total de 10.701 genes e 30,07 Mb (<http://www.broad.mit.edu/>; GALAGAN et al., 2005). Esse fungo possui uma frequência de transformação considerável e realiza recombinação sítio-específica. O conhecimento do genoma facilita a completa deleção, bem como a clonagem, a duplicação e a substituição de genes específicos. Além disso, promotores induzíveis podem ser utilizados para regular a expressão de genes clonados, sendo que o mais utilizado atualmente é o promotor do gene que codifica a enzima álcool

desidrogenase I (*alcA*), o qual é controlado pela disponibilidade de fontes de carbono (WARING et al., 1989).

O ciclo vegetativo de *A. nidulans* consiste na proliferação de hifas, células tubulares e multinucleadas, formadoras de tecido vegetativo denominado micélio. Este organismo é classificado como fungo perfeito, pois possui um ciclo sexual definido (Figura 11). Na ocasião da identificação desse ciclo, a espécie foi renomeada como *Emericella nidulans*, muito embora a designação do estado de fungo imperfeito e a nomenclatura *A. nidulans* ainda permaneçam (WARD, 1991). Os conídios, estruturas primárias de reprodução assexuada, apresentam um único núcleo estacionado em G1 (BERGEN; MORRIS, 1983) sendo capazes de se manterem dormentes, porém, viáveis, por longos períodos de tempo. O conídio germinante passa por uma etapa inicial de incorporação de água, na qual ele cresce isotropicamente pela disposição de novas camadas de parede celular em todas as direções (MOMANY; TAYLOR, 2000; HARRIS; MOMANY, 2004; OSMANI; MIRABITO, 2004). A primeira divisão nuclear ocorre aproximadamente 4 horas do início da incorporação de água. Após 8 horas, o conteúdo citoplasmático sofre um aumento de dez vezes e, o DNA, de oito vezes, compreendendo três divisões celulares (DOONAN, 1992). Surge, então, o tubo germinativo, gerando um eixo de crescimento polarizado. A disposição da parede celular exclusivamente na ponta do tubo germinativo é chamada de extensão apical, e confere à hifa um aspecto de um filamento alongado (HARRIS, 1999; MOMANY; TAYLOR, 2000). A remoção enzimática da parede celular leva à formação de protoplastos esféricos e à perda do crescimento polarizado. No entanto, se houver nova deposição de parede celular, o eixo polarizado se restabelece (DOONAN, 1992). A indução do estado de protoplastos nestes germinantes é um evento necessário e utilizado para as transformações em *A. nidulans*.

A citocinese em fungos filamentosos é estabelecida pela formação de septos que dividem as hifas, tornando-as uma estrutura modular composta por células individuais. Assim, como nos demais eucariotos, a citocinese em *A. nidulans* é coordenada com o ciclo celular, sendo que a formação do primeiro septo ocorre após a terceira mitose (HARRIS, 1997). Subsequentemente, cada ciclo de divisão celular resulta na formação de um septo adicional (HARRIS et al., 1994). As sucessivas divisões celulares e a formação do septo produzem uma hifa multicelular alongada na qual dois subcompartimentos podem ser identificados: (i) um compartimento apical que

continuamente cresce ao passo que o ciclo celular continua e, (ii) um compartimento subapical que entra em um período de quiescência mitótica e parada do crescimento (HARRIS, 1997). As ramificações do compartimento subapical geram uma nova extremidade hifal que repete o ciclo morfogênético. Esse padrão de crescimento observado nos fungos filamentosos permite a eles rapidamente colonizarem novos substratos (SEMIGHINI et al., 2005). A indução do ciclo sexual, com a formação de cleistotécios, ocorre devido a estresse como a redução da tensão de oxigênio, que em laboratório é induzida através da vedação da placa de cultivo (DOONAN, 1992). *A. nidulans* é homotático, ou seja, uma colônia originada de um único conídio é capaz de se autofecundar, realizando o ciclo sexual. O corpo de frutificação deste fungo, o cleistotécio, é uma estrutura esférica com coloração avermelhada. Em seu interior há cerca de 10 mil asci, cada um contendo oito ascósporos (esporos sexuais) binucleados (Figura 11). As células Hülle, cuja função é desconhecida, são estruturas globulares que recobrem os cleistotécios. O desenvolvimento do cleistotécio se inicia a partir de dois núcleos, os quais entram em divisão sincronizada para produzir uma hifa dicariótica precursora do cleistotécio, local aonde se acredita ocorrer a fusão nuclear que origina o zigoto diplóide. Os seus núcleos sofrem uma divisão meiótica, originando quatro núcleos haplóides, e cada um deles se divide mitoticamente, originando oito núcleos. A parede dos ascósporos, denominada cápsula perisporal, se forma ao redor de cada um destes núcleos. Após a individualização dos oito produtos, os seus núcleos sofrem uma divisão mitótica originando os esporos sexuais binucleados. Quando a fusão nuclear ocorre entre núcleos genotipicamente diferentes, o cleistotécio formado será híbrido. Os ascósporos presentes nestes cleistotécios poderão ser utilizados em análises genéticas. A cor dos esporos é em particular um marcador visual muito útil na análise genética (WARD, 1991).

Além dos ciclos assexual e sexual, *A. nidulans* apresenta ainda um ciclo parassexual (Figura 11), no qual as hifas de duas linhagens crescidas lado a lado se fusionam, formando o heterocário, um micélio que apresenta os núcleos das duas linhagens para a obtenção de uma progênie recombinante. A esporulação do heterocário forma diplóides estáveis, os quais podem ser usados na determinação de recessividade ou dominância de uma mutação, quando o alelo selvagem e o mutado estão presentes no mesmo núcleo. Um diplóide pode perder cromossomos gradativamente como resultado de falhas na separação de cromátides irmãs durante a mitose, voltando a ser haplóide. Este processo pode ser acelerado pelo uso de concentrações subletais do

fungicida benomil, um inibidor do rearranjo dos microtúbulos. O haplóide resultante contém alguns cromossomos de uma linhagem parental, e alguns, da outra. Assim, é possível mapear uma mutação num determinado cromossomo ou grupo de ligação através do uso de linhagens com marcadores específicos para cada um dos grupos de ligação. A análise dos segregantes haplóides derivados do cruzamento indica que o gene a ser mapeado reside no mesmo grupo de ligação do marcador ao qual ele não pode estar associado (WARD, 1991; KAUFER; MAY, 1998).

Figura 11 - Ciclo de vida do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. Extraído e modificado de CASSELTON; ZOLAN (2002)

2. Objetivos

Em *A. nidulans* e *A. niger*, os conhecimentos sobre a produção de celulases e hemicelulases é bastante limitado. Desta forma, como uma maneira de se avaliar e entender melhor o metabolismo destes fungos na regulação e produção de celulases e hemicelulases, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- (i) a análise do transcriptoma da cepa N402 de *A. niger* induzida em bagaço de cana-de-açúcar explodido, através de *microarray* de DNA;
- (ii) a validação dos resultados obtidos do transcriptoma, através de dosagens de atividade enzimática de xilanase e celulase;
- (iii) a validação dos resultados obtidos do transcriptoma através de RT-PCR em tempo real de genes envolvidos no sistema celulolítico e hemicelulolítico de *A. niger*;
- (iv) a análise do secretoma de *A. niger* induzida em bagaço de cana-de-açúcar explodido, através de espectrometria de massa;
- (v) “screening” da coleção de quinases e fosfatases não essenciais de *A. nidulans* (NPKs e NPPs, respectivamente);
- (vi) análise da atividade de PKA em *A. nidulans* em diferentes fontes de carbono, através da dosagem da atividade enzimática;
- (vii) a análise do transcriptoma das cepas selvagem, $\Delta schA$, $\Delta snfA$ de *A. nidulans* induzidas em MM+ avicel 1%, através de *microarray* de DNA;
- (viii) a análise da produção de celulases e xilanases em *A. nidulans*, através de dosagens de atividade enzimática;
- (ix) a análise de genes envolvidos no controle da transcrição do sistema celulolítico e hemicelulolítico de *A. nidulans*, através de RT-PCR em tempo real;
- (x) construção e avaliação da cepa CreA::GFP de *A. nidulans* em diferentes fontes de carbono, através de microscopia de fluorescência.

3. Materiais e Métodos

3.1 Genótipos das linhagens utilizadas nesse trabalho

Tabela 2 - Genótipos das linhagens de *A. nidulans* e *A. niger* utilizadas neste trabalho

Linhagens	Genótipo	Referência
N402	<i>Sem auxotrofia</i>	FGSC ^a
TNO2A3	<i>pyroA4; pyrG89; ΔnKuA::argB; chaA1</i>	Nayaka et al., 2006
ΔcyaA	<i>ΔcyaA::pyrG89; veA1</i>	Fillinger et al., 2002
RasA ^{G17V}	<i>argB::alcA(p)–rasA^{G17V}; veA1</i>	Fillinger et al., 2002
103 mutantes de quinases	<i>pyrG89; wA3; argB2; ΔnKuA^{Kuru}::argB</i> <i>pyroA4; sE15 nirA14 chaA1 fwA1)</i>	De Souza et al., 2013/ FGSC ^a
28 mutantes de fosfatases	--	Son; Osmani, 2009/ FGSC ^a
CreA::GFP	<i>pyroA4; pyrG89; ΔnKuA::argB; chaA1; creA::</i> <i>GFP::pyrG89</i>	Este trabalho
ΔsnfAxCreA::GFP	<i>Sem auxotrofia</i>	Este trabalho
ΔschAxCreA::GFP	<i>Sem auxotrofia</i>	Este trabalho
ΔatmAxCreA::GFP	<i>Sem auxotrofia</i>	Este trabalho

^aFGSC: Fungal Genetic Stock Center (www.fgsc.net)

3.2 Linhagem de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho

Tabela 3 - Linhagem de levedura utilizada neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Referência
SC9721	MATa his 3-D200 URA 3-52 leu2D1 lys 2D202 trp 1D63	FGSC ^a

^aFGSC: Fungal Genetic Stock Center (www.fgsc.net)

3.3 Vetores utilizados neste trabalho

Tabela 4 - Vetores utilizados neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Referência
pRS426	<i>amp^R lacZ URA3</i>	Christianson <i>et al</i> , 1992.
pCDA21	<i>Zeo::pyr amp^R</i>	Chaverroche <i>et</i> <i>al.</i> , 2000.
pMCB17apx	<i>alcA::GFP pyr 4</i> <i>amp^R</i>	Cedido pelo Dr. Vladimir Efimov.

3.4 Meios de Cultura

3.4.1 Meios de cultura para *Aspergilli*

3.4.1.1 Meio mínimo para *A. niger* (MM)

20X solução de sais (De Vries et al., 2004)	1X
Elementos traços (De Vries et al., 2004)	0,2% (v/v)
Glicose	1% (p/v)
Ágar	1,2% (p/v)

O pH foi ajustado para 5,5 com hidróxido de sódio (4M). Esterilizou-se em autoclave. Para MM líquido, não houve adição de 1,2% de Agar. Para MM com diferentes fontes de carbono, a glicose foi substituída por 1% frutose (p/v), 1% xilana (p/v), 1% xilose (p/v), 1% xilana + 2% glicose (p/v) e 0,5% de bagaço de cana explodido (p/v). O bagaço de cana explodido foi gentilmente cedido por Nardini Agroindustrial Ltda, Vista Alegre do alto, São Paulo, Brasil, através do Prof. Dr. João Jorge Atílio da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Antes da utilização o bagaço de cana “*in natura*” foi tratado e lavado. Tratou-se com 14 kg/cm² de vapor de água por oito minutos. Após o tratamento o bagaço explodido foi lavado exaustivamente com água destilada até os açúcares redutores não serem mais detectados pelo método DNS (MILLER, 1959). Após ter sido lavado, o bagaço de cana explodido foi completamente seco à 40⁰C por vários dias e estocado à temperatura ambiente.

3.4.1.2 Meio mínimo para *A. nidulans* (MM)

20x solução de sais (Kafer, 1977)	1x
Elementos traços	0,1% (v/v)
Glicose	1% (p/v)
Agar	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio (4M). Esterilizou-se em autoclave. Para MM líquido, não houve adição de 1,2% (p/v) de Agar. Para MM+Avicel, a glicose foi substituída por 1% de avicel (p/v).

3.4.1.3 Meio completo para *A. niger* (MC)

20x solução de sais (De Vries et al., 2004)	1x
Ácidos casamino	0,1%(p/v)
Extrato de levedura	0,5%(p/v)
Glicose	1% (p/v)
Ágar	1,2% (p/v)
Solução de elementos Traços	0,2% (v/v)

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. Para meio completo líquido não houve adição de ágar 1,2% (p/v).

3.4.1.4 Meio completo para *A. nidulans* (YAG, YUU, YG e YG+UU)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Glicose	2% (p/v)
Ágar	2% (p/v)
Solução de elementos Traços	0,1% (v/v)

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM. Para a regeneração dos protoplastos, utilizou-se MM + KCl (0,6M), adicionado de suplementos nutricionais necessários. Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente, aos meios YAG e YUU, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar de regeneração dos protoplastos foi adicionado 1% (p/v) de ágar.

3.4.2 Meio de cultura para *Escherichia coli*

3.4.2.1 Meio Luria Bertani (LB)

Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de Sódio	0,17 M
Triptona	1% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.4.3 Meio de cultura para *Saccharomyces cerevisiae*

3.4.3.1 Meio YPD

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.4.3.2 Meio Sintético para leveduras (SC)

Base Nitrogenada de Levedura	0,7%
Glicose	2,0%

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se suplemento de aminoácidos nas seguintes concentrações: leucina 0,1 g/L, lisina 0,1 g/L, triptofano 0,1 g/L e histidina 0,05 g/L. O meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.5 Soluções e tampões

3.5.1 Solução de sais 20X concentrada para MM de *A. niger*

Nitrato de Sódio	6 g
Cloreto de Potássio	0,5 g
Dihidrogenofosfato de Potássio	1,5 g
Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,5 g

Os componentes foram dissolvidos em água destilada para 1 L e então utilizados na composição do Meio Mínimo (DE VRIES et al., 2004).

3.5.2 Solução de sais 20X concentrada para MM de *A. nidulans*

Nitrato de Sódio	3,2 M
Cloreto de Potássio	0,14 M
Dihidrogenofosfato de Potássio	0,2 M
Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,04 M

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo (KAFFER, 1977).

3.5.3 Solução de elementos traços para *A. niger*

Sulfato de ferro heptahidratado	1 g
Cloreto de cálcio	1,47 g
Sulfato de Zinco heptahidratado	4,4 g
Cloreto de manganês tetra hidratado	1,01 g
Sulfato de ferro heptahidratado	18 mM
Cloreto de cobalto pentahidratado	0,32 g
Sulfato de cobre pentahidratado	0,315 g
Molibdato de amônio tetra hidratado	0,22 g
EDTA	10 g

Dissolveu-se primeiramente o EDTA e em seguida os próximos componentes em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH 6 com solução de hidróxido de potássio (10 M). Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final para 1 litro (DE VRIES et al., 2004).

3.5.4 Solução de elementos traços para *A. nidulans*

Sulfato de zinco heptahidratado	75 mM
Ácido bórico	180 mM
Cloreto de manganês tetra hidratado	25 mM
Sulfato de ferro heptahidratado	18 mM
Cloreto de cobalto pentahidratado	6 mM
Sulfato de cobre pentahidratado	6 mM
Molibdato de amônio tetra hidratado	1 mM
EDTA	140 mM

Os componentes foram adicionados na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de hidróxido de sódio (10 M). Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final.

3.5.5 Soluções para transformação em *Aspergilli*

3.5.5.1 Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM

Dissolveu-se o sulfato de amônio em água destilada e adicionou-se o volume adequado de solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Ajustou-se o volume e esterilizou-se em autoclave.

3.5.5.2 Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.5.5.3 Solução 3 de transformação

Sulfato de amônio	0,4 M
Sacarose	1% (p/v)
Ácido cítrico pH 6	50 mM

Sulfato de amônio e sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.5.5.4 Solução 4 de transformação

Polietilenoglicol PM 6000 g/mol	25% (p/v)
Cloreto de cálcio dihidratado	100 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1 M) previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.5.5.5 Solução 5 de transformação

Cloreto de cálcio dihidratado	50 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
MES pH 6,0	10 mM

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.5.6 Soluções para minipreparação de DNA plasmidial**3.5.6.1. Solução de lise alcalina**

Hidróxido de sódio	0,2 M
SDS	1% (p/v)

Preparou-se no momento do uso a partir de soluções estoque de NaOH 4 M e SDS 10%.

3.5.6.2 Solução de neutralização

Acetato de Potássio	3 M
Ácido acético glacial	7,5 ml

Dissolveu-se o acetato de potássio em água destilada e acrescentou-se o ácido acético. Ajustou-se o volume com água destilada para 500 ml e esterilizou em autoclave. Armazenou-se à 4°C.

3.5.7 Soluções para microscopia

3.5.7.1 Solução estoque de Hoescht 33258

Hoescht	100mg/ml
---------	----------

Dissolveu-se em água e ajustou-se para o volume final desejado.

3.5.7.2 Solução estoque de Azul de Toluidina

Azul de Toluidina	0,05% (p/v)
-------------------	-------------

Dissolveu-se em água e ajustou-se para o volume final desejado.

3.5.7.3 Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado

Cloreto de sódio	350 mM
Cloreto de potássio	180 mM
Hidrogenofosfato de sódio	25 mM
Dihidrogenofosfato de potássio	18 mM

Dissolveu-se em água destilada, acertou-se para pH 7,4 e completou-se o volume final. Esterilizou-se em autoclave.

3.5.7.4 Solução estoque de 2-deoxi-glicose

2-deoxi-glicose	500 mM
-----------------	--------

Dissolveu-se em água destilada e completou-se o volume final. Estocou-se à 4°C.

3.5.7.5 Solução estoque de 6-deoxi-glicose

6-deoxi-glicose 500 mM

Dissolveu-se em água destilada e completou-se o volume final. Estocou-se à 4°C.

3.5.8 Solução estoque de camptotecina

Camptothecin 200 mM

Dissolveu em DMSO e completou-se volume final. Estocou-se à -20°C.

3.5.9. Soluções estoque de requisitos nutricionais

As soluções estoques de vitaminas e aminoácidos para *Aspergilli* foram preparadas segundo Kafer (1977), como descrito na Tabela 5, sendo esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio de cultura de maneira estéril no momento do uso.

Tabela 5 - Soluções estoque de requisitos nutricionais recomendados para complementação das auxotrofias em *A. nidulans*.

Componente	Solução estoque [§]	Concentração/1L de meio de cultura
Vitaminas		
Ác. p-aminobenzóico (PABA)	0,17 g/100 ml H ₂ O	500 µL
Piridoxina-HCl (PIRO)	0,10 g/100 ml H ₂ O	50 µL
Riboflavina (RIBO)	2,5 µg/ ml H ₂ O	5 ml
Uréia	6% (p/v)	5 ml
Tiosulfato de sódio	8% (p/v)	12,5 ml
Pirimidinas		
5 mM Uridina	-	1,2 g
10 mM Uracila	-	1,2 g

[§] Soluções filtradas em filtro 0,45 µm (PVDF, Millipore).

3.5.10 Soluções para eletroforese

3.5.10.1 Tampão MOPS 10X concentrado

MOPS	0,2 M
Acetato de sódio	0,5 M
EDTA	0,01 M

Dissolveu-se os componentes em água deionizada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o pH foi ajustado para 7.

3.5.10.2 Tampão de amostra para eletroforese de RNA

Azul de Bromofenol	0,1 mg/ml
Glicerol	50% (v/v)
Tampão MOPS	1x

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.5.10.3 Tampão de amostra para eletroforese de DNA

Azul de Bromofenol	0,1 mg/ml
Xileno cianol	0,1 mg/ml
Glicerol	50% (v/v)

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.5.10.4 Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado

Tris Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M pH 8,0	100 ml
Água destilada q.s.p.	1 L

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.5.10.5 Tampão de extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5	200 Mm
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)

Dissolveu-se em água destilada.

3.5.10.6 Tampão de extração de proteína

p-nitrofenilfosfato	15mM
Tris base pH 7,5	25 mM
EGTA pH 7,5	15 mM
Cloreto de magnésio	15 mM

Dissolveu-se em água milli-Q e acertou-se o volume final para as concentrações finais, como indicado. Para uso, adicionou-se inibidores de protease nas concentrações finais adequadas.

3.6 Protocolos experimentais

3.6.1 Produção do cassete de fusão pela técnica de recombinação “in vivo” em *S. cerevisiae*

A ORF *creA* de *A. nidulans* foi clonada em fusão com a proteína fluorescente GFP. A construção realizada permitiu a ligação *in frame* da GFP à porção C-terminal da ORF de interesse. Especificamente entre a ORF e a GFP foram adicionados quatro códons que irão, após a tradução, inserir 4 aminoácidos espaçadores (glicina-treonina-arginina-glicina) denominado Spacer GFP (TEEPE et al., 2007). Em resumo, utilizado-se a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (New Engand Biolabs), a ORF *creA* foi amplificada por PCR juntamente com 1.0kb da região do 5'UTR a partir do DNA genômico da cepa selvagem de *A. nidulans* TNO2A3. Para a reação de PCR foram utilizados um oligonucleotídeo *forward* específico que se anelava na região 5'UTR da ORF e um oligonucleotídeo reverso que se anelava no final da ORF (oligonucleotídeos pRS426 CreA 5'UTR F + CreA spacer GFP R). O oligonucleotídeo reverso incluía a sequência do

spacer GFP. Todos os oligonucleotídeos utilizados para essa construção estão indicados na tabela 6. Para permitir a fusão C-terminal da proteína com a GFP, o *stop* códon do gene *creA* foi eliminado. Além disso, a sequência GFP-Spacer foi inserida entre a fração 3' da ORF e o gene GFP para permitir o correto enovelamento proteico. O gene *pyrG*, amplificado por PCR a partir do plasmídeo pCDA21, foi utilizado como marcador seletivo de prototrofia para uridina e uracila utilizando-se os oligonucleotídeos GFP *pyrG* F e *pyrG* R (tabela 6). A ORF que codifica a GFP foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pMCB17apx (gentilmente cedido por Vladimir P. Efimov). A construção do cassete de fusão também exigiu a amplificação de um fragmento da região flanqueadora 3'UTR da ORF utilizando-se os oligonucleotídeos *pyrG* *CreA* 3'UTR-F e pRS426 *CreA* 3'UTR-R como indicado na tabela 6. Esses fragmentos foram amplificados por PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *A. nidulans* TNO2A3 como molde. Os oligonucleotídeos pRS426 *creA* 5'UTR-F e pRS426 *creA* 3'UTR-R possuíam pontas coesivas com o vetor pRS426 (figura 12 A) o qual foi linearizado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O vetor linearizado, os fragmentos 5'UTR+ORF, spacer GFP, *pyrG* e 3'UTR foram purificados do gel de agarose utilizando-se QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e utilizados em quantidades equimolares para a transformação da cepa de *S. cerevisiae* SC9721 utilizando-se o método de transformação por acetato de lítio (SCHIELSTL; GIETZ, 1989). O cassete de fusão obtido continha a região flanqueadora 5'-UTR seguida do gene *creA* de *A. nidulans* e ainda a sequência da proteína fluorescente GFP e o marcador de prototrofia *pyrG* seguida da região flanqueadora 3'-UTR do gene *creA*. O esquema abaixo ilustra a abordagem utilizada para a fusão do gene *creA* (figura 12 B).

Posteriormente, o DNA genômico de um “pool” dos transformantes em levedura foi extraído de acordo com Goldman e colaboradores 2003. O DNA total foi dialisado e cerca de 200 ng foram utilizados na eletroporação em bactéria, *E. coli* DH10B, eletrocompetente. Os clones de bactéria foram selecionados pela resistência à ampicilina, conferida também pelo plasmídeo pRS426. Os clones positivos foram submetidos a uma minipreparação de DNA plasmidial e realizou-se uma reação de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos distais 5F e 3R para a amplificação do cassete completo de substituição gênica. Esse material foi fracionado em gel de agarose 1 % (p/v), corado com brometo de etídio e a banda específica foi purificada do gel para ser usada nas reações de transformação em *Aspergilli*. Os transformantes foram selecionados a partir da habilidade de crescerem em meio mínimo isento de uridina e uracila e checados por PCR para confirmar a integração homóloga do cassete.

Figura 12 - Estratégia para obtenção do cassete de fusão com GFP. (A) Representação do vetor pRS426 utilizado na recombinação homóloga em leveduras para a construção do cassete de fusão. **(B)** Representação do mecanismo de recombinação homóloga em *S. cerevisiae* para o obtenção do cassete de fusão no vetor pRS426.

Tabela 6 - Descrição de primers de *A. nidulans* utilizados neste trabalho

Nome do primer	Sequência 5' - 3'
pRS426-CreA 5UTR_F	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCTTTTCTTTTTGCCCTTTTCG
pRS426-CreA 3UTR_R	GCGGTTAACAATTTCTCTCTGGAAACAGCCGTCTGAAAGTACCCCAAGC
CreA spacer GFP_R	AGTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCGAACCTCTCAGCCAAGTCACC
PyrG-CreA 3UTR_F	ATTGTTTGAGGCGAATTCTCCGGCCAAAAAACTTCG
pRS426-SnfA 5UTR_F	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTGGAGATGGAAGTCGAAAGG
pRS426-SnfA 3UTR_R	GCGGTTAACAATTTCTCTCTGGAAACAGCGCGGTCTGTTAGACGTTTCC
SnfA spacer GFP_R	AGTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCGCTTCTCCTAGTATAGTAGG
PyrG-SnfA 3UTR_F	ATTGTTTGAGGCGAATTCCTGGTGAAAGGAAATGCC
GFP-PyrG_F	GCAATGCAAGCTTGGCGTATTCTGTCTGAGAGGAGGC
GFP_R	CTCAGACAGAATACGCCAAGCTTGCATGC
PyrG_R	GAATTCGCCTCAAACAATGCTCTTCACC
Spacer GFP_F	GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG
CreA Insert check	ATAGACATGCCGTCACATGG ATAGACATGCCGTCACATGG
SnfA Insert check	GCCTGTGTCATCGTGATAGC
SchA 5UTR_F	TCTTGAGACGCACATTGACC
SchA exon_R	CAGGAGGACGAGATTCTTGC

3.6.2 Transformação em *Aspergilli*

A transformação em *A. nidulans* seguiu metodologia descrita por Osmani et al. (1987). Foi utilizada a cepa TNO2A3. A linhagem TNO2A3 trata-se de um mutante cujo homólogo de KU70 de *A. nidulans* (*nkuA*) está inativado (NAYAK et al., 2006). Sabe-se que o produto do gene *ku70* é essencial para o processo de “non homologous end joining” (NHEJ) no reparo do material genético. A exemplo do que foi verificado inicialmente em *N. crassa* (NINOMIYA et al., 2004), a inativação do gene *ku70* leva a ruptura do sistema de NHEJ e todo o DNA exógeno introduzido na célula durante o processo de transformação é direcionado para a via de recombinação homóloga, o que aumenta consideravelmente a eficiência da transformação e a inserção do cassete de interesse no locus do gene de interesse (NINOMIYA et al., 2004). Da mesma forma, a taxa de recombinação homóloga é aumentada, chegando até 100% na linhagem TNO2A3 (NAYAK et al., 2006).

3.6.2.1 Produção de protoplastos

Um inóculo de aproximadamente 10^7 conídios da cepa a ser transformada foi incubado a 37°C por 16 horas em 50 mL de meio MM acrescido de suplementos apropriados. Os tubos germinativos foram coletados e, em seguida, ressuspensos na seguinte solução de protoplastização: 20 mL de Solução 1 de Protoplastização, 20 mL de Solução 2 de Protoplastização, 6,5 mL de Sulfato de Magnésio 1 M, 400 mg de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) e 300 mg de Glucanex® (Novo Nordisk Ferment, Dinamarca). A enzima Glucanex apresenta uma mistura de atividades, incluindo glucanase, quitinase e protease, utilizada na digestão da parede celular dos tubos germinativos, na presença do estabilizador osmótico BSA. Os protoplastos foram obtidos após 5 horas de incubação a 30°C sob agitação (80 rpm), sendo então separados dos restos celulares por filtração em lã de vidro estéril.

3.6.2.2 Transformação

Os protoplastos foram coletados por centrifugação a 3220 g por 10 minutos e lavados duas vezes com Solução 3 de Protoplastização gelada para se retirar o excesso de enzimas. Para equilibrar osmoticamente os protoplastos, os mesmos

foram ressuspensos no volume apropriado de Solução 5 de Protoplastização, e incubados no gelo por 10 minutos. Para a transformação foram adicionados 4-20 µg do DNA a 100 µL de protoplastos, e 50 µL da Solução 4 de Protoplastização contendo PEG para promover a fusão das membranas dos protoplastos. O DNA entra no protoplasto na forma de um precipitado de cálcio, também presente na Solução 4, provavelmente através de transporte vesicular. Após incubação dessa solução em gelo por 20 minutos, adicionou-se 1mL da Solução 4 de Protoplastização com posterior incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. A suspensão de protoplastos foi transferida para 30 ml de meio mínimo top ágar acrescido de KCl e suplemento necessário e semeada em meio de regeneração apropriado também contendo KCl a 37°C, até o aparecimento de colônias transformantes.

3.6.3 Extração de DNA genômico de *Aspergilli*

Para a produção de biomassa de micélio, esporos das cepas de interesse de *A. nidulans* foram inoculados em meio de cultura completo e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 250 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Para cada cerca de 40 mg de micélio foram acrescentados 500 µL de Tampão de Extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e agitado mecanicamente em agitador de tubos por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares, as amostras foram centrifugadas a 20.817 g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20.817 g por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 540 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20.817 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20.817 g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água milliQ estéril, estocado a 4°C e

quantificados utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.6.4 Extração de DNA genômico de *S. cerevisiae*

Um “pool” de células de *S. cerevisiae* transformado com o plasmídio pRS426 e os fragmentos para a produção do cassete de fusão contendo o gene de interesse fusionado a proteína GFP foram selecionados em meio SC-URA e semeados em 10 ml do mesmo meio de cultivo e incubados a 30°C por 48 horas sob agitação constante. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 1699 g por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de tampão de extração de DNA. À esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro tratadas com ácido nítrico para a retirada de impurezas. Os tubos contendo as células, o tampão e as pérolas de vidro foram acoplados em agitador mecânico e a ruptura celular procedeu-se por 10 minutos. Após este período, o material, sem as pérolas de vidro, foi transferido para um novo tubo contendo o mesmo volume de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1) e novamente o material foi agitado em agitador mecânico por 10 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada 20.817 g por 20 minutos e a fase aquosa contendo o DNA genômico foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugado por 20 minutos a 20.800 g. O DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água deionizada estéril. Foi adicionado 1 µL de solução de RNase A (10 mg/ml) e a solução foi incubada a 37°C por 12 horas. A concentração e pureza do DNA foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.6.5 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10B foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB a 37°C e 200 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific) por 16 horas. Este pré-inóculo foi adicionado a 1 L de LB e cultivada a 37°C sob agitação de 250 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific), até que a densidade óptica da cultura a 600 nm atingisse 0,4 a 0,5. O frasco da cultura foi resfriado em

banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 *g* a 4°C por 15 minutos. As células precipitadas foram cuidadosamente ressuspensas em 500 mL de água destilada estéril resfriada a 0°C. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente lavadas como descrito anteriormente. Tais lavagens com água promovem a diminuição da força iônica da suspensão de células, facilitando a entrada do DNA a ser transformado na bactéria. Em seguida, as células são equilibradas em 50 mL de solução de glicerol 10% (v/v) resfriada a 0°C e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado foi ressuspendido em glicerol 10% (v/v) com volume necessário para atingir uma concentração de 1 a 3×10^{10} células/mL (aproximadamente 40 µL de suspensão de células). A suspensão de células eletrocompetentes foi aliqüotada em microtubos e estocada a -80°C até o momento do uso.

3.6.6 Eletrotransformação de *E. coli*

O DNA plasmidial dialisado por 1 hora em membrana com poros de 45 µm (PVDF, Millipore) contra água MilliQ foi acrescentado a 1 a 3×10^{10} células eletrocompetentes da linhagem DH10B, misturando-se gentilmente. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (BioRad) previamente resfriadas a 0°C e submetida a 25 µF, 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser (BioRad, EUA). A seguir, 1 mL de meio LB foi adicionado à mistura, e esta transferida para tubos de ensaio estéreis e incubada a 37°C (200 rpm). Após uma hora, a cultura foi semeada em LB sólido acrescido da concentração adequada de antibiótico apropriado e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas.

3.6.7 Minipreparação do DNA plasmidial

Para estabelecimento da cultura pura, os clones de interesse foram inoculados em cerca de 2,0 mL de meio LB adicionado do antibiótico ampicilina (100 µg/mL) para a seleção do plasmídeo em tubos falcons de 15 mL. As culturas foram incubadas em um agitador orbital (200 rpm) a 37°C por 22 a 24 horas. Depois do crescimento, os tubos foram centrifugados a 3220 *g* por 6 min para precipitar as células. O sobrenadante foi descartado e ao pellet resultante foram adicionados 100 µL da solução GET. As culturas foram agitadas para a ressuspensão do pellet e, em

seguida, foi adicionada a solução de lise alcalina. Os tubos permaneceram parados por 5 minutos a temperatura ambiente e adicionaram-se 200 μ L da solução de neutralização de acetato de potássio 3 M, seguindo-se incubação a 4°C ambiente por 15 minutos. Seguiu-se uma centrifugação de 25 minutos a 20.817 g. Após essa centrifugação todo o sobrenadante resultante era transferido para um novo tubo. Ao qual adicionou-se o mesmo volume de isopropanol absoluto. Para precipitação do DNA plasmidial os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 20.817 g. O sobrenadante foi descartado e 200 μ L de etanol 70% adicionado a cada tubo. Após uma nova centrifugação por 5 minutos a 20.817 g, o sobrenadante foi descartado. Depois disso, o DNA era eluído adicionando-se 40 μ L de água milliQ com 1 μ g/ μ L de RNase A (Quiagen, Alemanha). A qualidade do DNA plasmidial foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo (10 μ g/ μ L) para assegurar a quantidade necessária para as aplicações posteriores.

3.6.8 Extração e manipulação de proteínas em *A. nidulans*

Para a dosagem de proteína total, 1×10^7 conídios dos mutantes de quinases, fosfatases e cepa selvagem foram inoculados em 50mL de MM+avicel 1% (p/v) à 180 rpm, 37°C, por 10 dias. Em seguida, foram filtrados a vácuo e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar a degradação de proteínas. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo. As proteínas totais foram obtidas com 1 mL do tampão de extração de proteína, agitando-se por 10 vezes de 30 segundos com intervalos de 30 segundos em gelo para minimizar a degradação. As amostras foram centrifugadas a 20.817 g por 45 minutos a 4°C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante de cada amostra foi estocado a -80°C. A concentração total de proteínas foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) com reagente comercial (BioRad).

3.6.9 Extração e manipulação de RNA em *A. nidulans* e *A. niger*

Para *A. nidulans*, 1×10^7 conídios dos mutantes das quinases e fosfatases juntamente com a cepa selvagem foram inoculados em 30 mL de MM+frutose 1% (p/v) por 24 horas à 37°C. Após esse tempo, as culturas foram transferidas para MM+avicel

1% (p/v) e incubadas por 120 horas à 37°C. Para *A. niger*, 1×10^6 conídios do fungo *A. niger* N402 foram inoculados em 30 mL de MM contendo 1% de frutose (p/v) à 30°C por 24 horas. Em seguida a cultura foi transferida para MM sem fonte de carbono contendo xilana 1% (p/v), xilose 1% (p/v) ou xilose 1%+glicose 2% (p/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) por 1 e 4 horas à 30°C. O micélio de todas as culturas foi filtrado a vácuo em filtro Whatman número 1 (GE Healthcare, Grandview Blvd. Waukesha, WI, USA), lavado exaustivamente com água destilada e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001), tendo como critério a presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda. Os RNAs foram quantificados utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e após tratados com DNase livre de RNA num volume final de 50 µL, contendo: 1X Buffer DNase (40 mM Tris-HCl pH 7,5 e 6 mM MgCl₂); 2,5 µL de ditioneitol (100 mM, Invitrogen, EUA); 1 µL of RNase Out (40 U/µL, Invitrogen, EUA), 5 µL de DNase (1 U/µL, Promega, Madison, EUA), e 20 µg de RNA alvo. A reação foi incubada a 37°C por 180 minutos, seguindo-se a etapa de purificação pelo método de fenol clorofórmio (1:1) e precipitação do RNA com 0,6 vol de isopropanol por 16 horas a -80°C para aumentar o rendimento. A ausência de DNA após tratamento foi verificada por reação de PCR em tempo real na qual era utilizada sonda fluorescente do gene constitutivo *tubC* para *A. nidulans* e do gene *actina* para *A. niger*. Amostras com detecção de sinal negativo foram utilizadas para a síntese do cDNA.

Para a produção do cDNA usados nas reações de PCR em tempo real, foram utilizados 20 µg de RNA total livre de DNA contido num volume de 12 µL e 1,5 µL de Oligo dTV (100 µM estoque). A mistura foi aquecida a 75°C por 10 minutos, rapidamente centrifugada e acondicionada em gelo. A seguir foram adicionados 5 µL de First Strand Buffer (5X, Invitrogen); 2,5 µL de DTT (100 mM, Invitrogen); 2 µL de RNase Out (40 U/µL, Invitrogen); 2,5 µL de dNTP (10 mM cada). O tubo foi aquecido a 42°C por 5 minutos e a seguir 1 µL da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen EUA; 200U/µL) foi adicionado. A reação foi incubada a 42°C por 180 minutos para síntese.

3.6.10 Reação de PCR em tempo real (“Real time RT-PCR”)

O Kit TaqMan® PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado nas reações de PCR em tempo real, segundo as instruções do fabricante. Os *primers* e sondas fluorescentes utilizados no trabalho utilizando a tecnologia Taq-Man® foram desenhados através do software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, EUA) e estão descritos na tabela 7. Os *primers* e sondas fluorescentes utilizados no trabalho utilizando-se a tecnologia LUX® (Invitrogen) foram desenhados seguindo-se as instruções do fabricante através do endereço eletrônico (<<http://orf.invitrogen.com/lux>>) e estão descritos na tabela 7. Os fluoróforos usados na construção das sondas fluorescentes também estão indicados na mesma tabela. As condições de termociclagem para reações de PCR em tempo real compreendem uma etapa inicial a 50°C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15" a 95°C e 1' a 60°C.

Inicialmente, foram realizadas curvas de calibração para cada par de *primers* com diferentes concentrações de DNA genômico. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das curvas de calibração foi determinada através de duas considerações: (i) o *A. nidulans* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma e (ii) considerando-se o tamanho do genoma de *A. nidulans* igual a 30 Mb, um genoma corresponde a aproximadamente 30×10^{-15} g; logo, teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. nidulans* correspondem a uma cópia de cada um dos genes do fungo. Diluições seriadas de 1 a 10^7 cópias do genoma da linhagem selvagem GR5 e N402 para *A. nidulans* e *A. niger*, respectivamente, foram utilizadas para construir as curvas padrão para cada gene investigado. A equação da reta obtida para cada curva padrão, bem como seu respectivo coeficiente de correlação linear (r^2) foram obtidos em cada experimento. As possíveis variações na concentração inicial de mRNA entre as amostras foram calculadas através da normalização com um gene constitutivamente expresso, neste caso, o gene da tubulina C (*tub C*) e actina para *A. nidulans* e *A. niger*, respectivamente, de acordo com Semighini et al. (2002). O aparelho para detecção imediata da fluorescência utilizado nos experimentos de PCR em Tempo Real foi o 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabela 7 - Descrição de primers e sondas fluorescentes LUX® e TaqMan® de *A. niger* e *A. nidulans* utilizados neste trabalho

Nome do Gene	Número de Acesso	Sequência 5' - 3'
<i>A. Niger</i>		
<i>Actina</i>	An15g00560	TACCACCAGACATGACAATGTTGC cggacTGAAGTGTGATGTTGATGTC[FAM]G
<i>cbhA</i>	An07g09330	CCTGTGACAGCAGCGAACAGAC cggtgTCATCCGAGTAGGTTCCAC[FAM]G
<i>cbhB</i>	An01g11660	CCTGTGACAGCAGCGAACAGAC cggtaCTGCGACTACAACCCCTAC[FAM]G
<i>eglA</i>	An14g02760	GTCCTGGGAGGTGTGGTATGG cggaaTATGAGTTGATAGGGCTTTC[FAM]G
<i>eglB</i>	An07g08950	CTCCAGTACATCGGATTTCCAGAC cgggAGTCGTTATCTTTGTACTGGCC[FAM]G
<i>eglC</i>	An01g01870	TATTGGGAGCGGATGCACAG cggcATAGGACCGGGTAGTCGC[FAM]G
<i>xynB</i>	An01g00780	TACAAGGGCACCGTCACCTC cggcAGCATTGGTACGGGTAGC[FAM]G
<i>xlnD</i>	An01g09960	TCGAAGAAGCCGGATACAAAGTC cggtaGTGCTTGTGGAGGAGATAC[FAM]G
<i>Hxt5</i>	An06g00260	GGGACTCCGGGCAGAAGTAGA cgggtTCTCATGCTCGGATCAAC[FAM]G
<i>xylT</i>	An01g00850	AAAGAACAGCAGCCTTGATTTTCG cggcCCAAGCTCAGAAGACTGC[FAM]G
<i>HGT1</i>	An15g05440	CAGGGAGTGACGGGAGGTCT cgtttAGTGTTTCATCTGGGGAAA[FAM]G
<i>AmMst-1</i>	An02g11260	GCCGATGTATCAGGCGGAGT cgggTCACTACACACCAACTTCC[FAM]G
<i>HGT1</i>	An01g14620	CCAACAATTCACGGGATCAAAT cggtgGGTCTCCTGGAACATCAC[FAM]G
<i>Hxt3</i>	An05g00730	GTTGCGGCATCTCCTTTGGAA cggatCGTAGCTGCAAGCATATC[FAM]G
<i>Mal11</i>	An06g00620	CACTATCATTTCCGAGACCTCGTC cggtcGTGATGTAGTACGCGGAC[FAM]G
<i>HXT1</i>	An11g03700	CCTCAACCTCGCTGGTATGTGT cgtgagCCTGCCAAGGATGATAAACTCA[FAM]G
<i>Lac12</i>	An12g09270	GTGTATTCGGCTGGCTGGAC cggtatTTCGCCCCGACTCTCATAC[FAM]G

Nome do Gene	Número de Acesso	Sequência 5' - 3'
<i>hxtA</i>	An14g01600	CTCATCTGGCTTGTCTTTGCAC cgggCGATGCAGACTGACTACC[FAM]G
<i>A. nidulans</i>		
<i>eglA</i>	An1285	GCCTGCGTCAGTTCTACTATCG CCCCAGTTTCCCGTTCTCT[FAM]G
<i>eglB</i>	An3418	GGAGGCTAATTGCGGAGTAC CTCAGTTTCCTCCGGCTCATATAAA[FAM]G
<i>tubC</i>	An6838	GCCGTCGCCGAAAGTG TGCACCGATAACGTCGCATTA[FAM]G

3.6.11 Determinação do peso seco em *A. nidulans*

1×10^7 conídios dos mutantes de quinases e fosfatases juntamente com a cepa selvagem foram inoculados em 50 mL de meio completo e MM+glicose 2% (p/v), respectivamente, à 180 rpm, 37°C, por 24 e 48 horas, respectivamente. Em seguida, foram filtrados a vácuo, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e liofilizados para a determinação do peso seco.

3.6.12 Dosagem da atividade enzimática de PKA em *A. nidulans*

1×10^7 conídios das cepas selvagem, $\Delta pkaC$ e ΔcyA foram inoculados em 50 mL de MM+frutose 1% (p/v) à 37°C por 24 horas. Após esse tempo, a cultura da cepa selvagem foi transferida para MM contendo glicose 1% (p/v), glicose 0.1% (p/v), xilose 1% (p/v), glicose 1%+xilose 1% (p/v), celobiose 1% (p/v), avicel 1% (p/v) e para MM sem fonte de carbono por 8 horas. A cultura das cepas $\Delta pkaC$ e ΔcyA foram transferidas para MM+glicose 1% (p/v) e MM+avicel 1% (p/v) e MM sem fonte de carbono por 8 horas. O micélio das culturas de transferência foi recolhido por filtração, e depois congelados e triturados em nitrogênio líquido. A proteína total foi extraída como descrito na seção 3.6.8. e realizou-se o ensaio de atividade PKA dependente Peptag cAMP (Promega) de acordo as instruções do fabricante. A quantificação da intensidade do substrato fosforilado foi determinada por análise de densitometria utilizando o programa ThelimageJ. Os resultados são apresentados como a atividade de PKA total por cultura.

3.6.13 Cruzamentos entre linhagens de *A. nidulans*

As linhagens com auxotrofias contrastantes a serem cruzadas foram inoculadas lado a lado em meio completo adicionado de suplementos adequados e incubadas a 37°C até que o crescimento das duas linhagens se encontrasse. A região de anastomose das hifas contendo os heterocários foi recortada e transferida para placas contendo meio mínimo, onde apenas os heterocários são capazes de crescer (PONTECORVO et al, 1953). Para os experimentos de indução do ciclo sexual, a placa contendo os heterocários foi selada com fita adesiva para reduzir a tensão de oxigênio. Após incubação por cerca de 10 dias a 30°C, os cleistotécios foram isolados com o auxílio de estereomicroscópio e limpos em uma placa de Petri contendo ágar 4 % (p/v) estéril. Este passo remove os conídios e as células Hülle aderidos à parede dos cleistotécios. Os cleistotécios foram rompidos em microtubos contendo água, a fim de se liberar os ascosporo. Os cleistotécios híbridos foram selecionados através da identificação dos marcadores genéticos das linhagens parentais nas colônias resultantes do crescimento da suspensão de ascosporo, chamadas de segregantes meióticos. Um marcador de fácil visualização que permite a seleção dos cleistotécios híbridos é a coloração dos segregantes meióticos, mas também as marcas auxotróficas esperadas após o cruzamento. As linhagens CreA::GFPx Δ *snfA*, CreA::GFPx Δ *schA* e CreA::GFPx Δ *atmA* foram obtidas por essa técnica. A confirmação das cepas CreA::GFPx Δ *snfA*, CreA::GFPx Δ *schA* foi realizada por reação de PCR utilizando-se primers para amplificação da ORF de interesse, enquanto que a cepa CreA::GFPx Δ *atmA* foi confirmada através da sensibilidade à camptotecina (75 μ M).

3.6.14 Experimentos de microscopia de fluorescência em *A. nidulans*

As células foram analisadas em temperatura ambiente. As imagens foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Carls Zeiss (Alemanha) usando ampliação de 100x em objetiva de imersão em óleo (EC Plan-Neofluar, NA 1.3) equipado com lâmpada de mercúrio apifluorescente 100W HBO, com excitação 359/498 nm e emissão 461/516 nm para Hoescht e GFP, respectivamente. As imagens de contraste de fase em campo claro e as imagens fluorescente foram capturadas pela câmera AxionCam (Carl Zeiss), todas as imagens foram processadas usando o software AxioVision versão 3.1 e salvas como arquivo JPEG.

Processamentos posteriores foram feitos usando o programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA, USA).

3.6.14.1 Análise da cepa CreA::GFP em glicose 1% e avicel 1%

Incubou-se cerca de 1×10^4 conídios da cepa CreA::GFP sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo 2 mL de MM+glicose 1% (p/v) ou MM+avicel 1% (p/v) por 16 horas a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com tampão PBS 1x e coradas com 100ng/mL de Hoescht 33258 (Molecular Probes) por 2 minutos. Após o tempo de coloração, as lamínulas foram incubadas em tampão PBS 1X por 5 a 10 minutos para descoloração e então montadas em lâminas contendo uma gota de solução de montagem (glicerol 50% em PBS 1X) para a análise em microscópio de fluorescência como descrito na seção 3.6.14.

3.6.14.2 Análise da cepa CreA::GFP em diferentes fontes de carbono

Incubou-se cerca de 1×10^4 conídios da cepa CreA::GFP sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo 2 mL de MM+glicose 1%, MM+avicel 1% (p/v) ou MM+xilose 1% (p/v) por 16 horas à 25°C.. Após esse tempo, as células foram lavadas com MM sem fonte de carbono e as que foram crescidas em MM+glicose 1% (p/v) foram transferidas para MM contendo xilose 1% (p/v), celobiose 1% (p/v) e glicerol 1% (v/v) por 2 horas e xilana 1% (p/v), avicel 1% (p/v) e MM sem fonte de carbono por 5 horas. As células que foram crescidas em MM+avicel 1% e MM+xilose 1% foram transferidas para MM+glicose 1% (p/v) por 1 hora. Em seguida as lâminas foram montadas contendo uma gota de solução de montagem (glicerol 50% em PBS 1X) para a análise em microscópio de fluorescência como descrito na seção 3.6.14.

3.6.14.3 Análise da cepa CreA::GFP em presença de 2-deoxi-glicose e 6-deoxi-glicose

Incubou-se cerca de 1×10^4 conídios da cepa CreA::GFP sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo 2 mL de MM+glicose

1% (p/v) por 16 horas à 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com MM sem fonte de carbono e transferidas para o mesmo meio sem carbono contendo 6 mM de 2-deoxi-glicose (Sigma) ou 6 mM 6-deoxi-glicose (Sigma) por 1 hora. Em seguida as lâminas foram montadas contendo uma gota de solução de montagem (glicerol 50% em PBS 1X) para a análise em microscópio de fluorescência como descrito na seção 3.6.14.

3.6.14.4 Análise das cepas CreA::GFPx Δ *snfA*, CreA::GFPx Δ *schA* e CreA::GFPx Δ *atmA* em glicose 1% e avicel 1%

Incubou-se cerca de 1×10^4 conídios das cepas CreA::GFPx Δ *snfA*, CreA::GFPx Δ *schA* e CreA::GFPx Δ *atmA* sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo 2 mL de MM+glicose 1% (p/v) por 16 horas a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com tampão PBS 1x e transferidas para MM+avicel 1% (p/v) por 5 horas. Em seguida as lâminas foram montadas contendo uma gota de solução de montagem (glicerol 50% em PBS 1X) para a análise em microscópio de fluorescência como descrito na seção 3.6.14.

3.6.15 Análise de *A. niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido com Azul de Toluidina

Incubou-se cerca de 1×10^4 conídios de *A. niger* em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de MM sem fonte carbono e MM sem fonte de carbono adicionado de 0,5% (p/v) de BE por 24 horas à 30°C sob agitação de 200 rpm. Após esse tempo as células foram centrifugadas à 20.617 g por 3 minutos e descartou-se o sobrenadante. No precipitado foi adicionado 50 µl de Azul de Toluidina 0,05% (p/v) e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, centrifugou-se novamente à 20.817 g, por 3 minutos e descartou-se o corante. Lavou-se duas vezes com 1 mL de água destilada por 5 minutos e ressuspendeu-se em 200 µl de água. Após montou-se a lamínula contendo uma gota de solução de montagem (glicerol 50% em PBS 1X) para a análise em microscópio de contraste de fase em campo claro. O corante Toluidine Blue O cora a parede celular de plantas, diferenciando-o do fungo filamentoso.

3.6.16 Dosagem da atividade de xilanase e celulase em *A. niger* e *A. nidulans*

Os ensaios para dosagem de xilanase (endo-1,4- β -xilanase) e celulase (endo-1,4- β -glucanase) foram realizados utilizando-se, respectivamente, azo-xilana (Birchwood) e azo-CM-celulose como substratos, de acordo com o manual do fabricante (Megazyme International, Bray, Ireland). Aos sobrenadantes das induções de interesse foi adicionado tampão acetato 100 mM (pH 4,5), em volume apropriado. As reações consistiam 0,5 mL de preparação enzimática tamponada (sobrenadante) e 0,5 mL da solução de substrato (azo-xilana ou azo-CM-celulose a 1% (p/v). As amostras foram incubadas a 40 °C por 10 minutos e as reações foram interrompidas acrescentando-se 2,5 mL de etanol 95% (v/v), sob vigorosa agitação. O substrato não degradado pela ação enzimática foi então precipitado por centrifugação (1000 x g por 10 minutos) e a absorbância foi determinada a 590 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o software MegaCalc™ (disponível em www.megazyme.com), sendo representada em U/mL. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.6.17 Análise de expressão gênica das cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$ de *A. nidulans* através de hibridações de *microarray*

3.6.17.1 Extração e manipulação de RNA para as hibridações de *microarray* em *A. nidulans*

1×10^7 conídios das cepas $\Delta schA$, $\Delta snfA$ e selvagem TNO2A3 foram inoculados em 50 mL de meio completo à 37°C por 24 horas. Após esse tempo, lavou-se a cultura com 20 mL de água destilada estéril e transferiu-se para 50 mL de MM+avicel 1% (p/v) por 8 e 24 horas à 37°C. O micélio das culturas foi filtrado a vácuo em filtro Whatman número 1 (GE Healthcare, Grandview Blvd. Waukesha, WI, USA), lavado exaustivamente com água destilada e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), segundo instruções do fabricante e purificados utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen), segundo as especificações do fabricante. A

integridade do RNA foi observada utilizando-se o kit Bioanalyser Nano (Agilent technologies) e o aparelho Agilent Bioanalyser 2100. Os RNAs foram quantificados utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.6.17.2 Marcação e hibridização dos RNAs e geração das imagens de *microarray* de *A. nidulans*

Para a análise de genes diferencialmente expressos nas cepas $\Delta schA$, $\Delta snfA$ e selvagem, durante indução em MM+avicel 1% (p/v) por 8 e 24 horas, utilizou-se a medição da expressão gênica através de procedimento de *microarray*. Este procedimento foi realizado utilizando-se lâminas (4 x 44k *microarray*) contendo oligonucleotídeos fabricadas pela Agilent Technologies™, baseada na anotação do genoma de *A. nidulans* disponível na literatura. Os RNAs extraídos dos micélios e purificados foram marcados com cianina-3 ou cianina-5, Cy-3- ou Cy-5-dUTP, respectivamente, utilizando-se o kit Two-Color *Microarray*-based gene expression analysis (Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies™, USA), de acordo com o manual do fabricante.

Inicialmente, o RNA total das amostras (5µg) foi incubado com os controles internos do kit, na diluição adequada (RNA Spike A ou B). Após, foi realizada a síntese de cDNA, incubando-se as amostras na presença do primer T7 promoter. A desnaturação do primer foi realizada a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado à reação o cDNA Master Mix (5X First Strand Buffer, DTT 0,1 M, dNTP mix 10 mM, MMLV-RT e RNaseOut). Esta mistura foi incubada a 40°C por 2 horas para síntese de cDNA, sendo posteriormente colocada a 70 °C por 15 minutos. A seguir foi realizada a síntese de cRNA, adicionando-se às amostras o mix do fabricante (Agilent™ Transcription Master Mix, contendo 4X Transcription Buffer, DTT 0,1 M, NTP mix , 50% PEG, RNaseOut, pirofosfatase inorgânica e T7 RNA polymerase). À esta mistura foram adicionados os marcadores Cy-3 nas amostras controle (meio completo 24 horas) ou Cy-5 nas amostras induzidas em avicel 1% (p/v) por 8 e 24 horas. Para a síntese de cRNA marcado as reações foram incubadas a 40°C por 2 horas. O cRNA marcado foi finalmente purificado utilizando-se o kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) e quantificados através do NanoDrop® 2000 Thermo Scientific (Uniscience).

Para a hibridação, foram misturados 825 ng de cada cRNA das amostras marcadas com Cy-3 (controles) com 825 ng de cRNA marcado com Cy-5 (indução). À mistura foi adicionado o Agilent™ Fragmentation Mix (10X Blocking agent, 25X fragmentation buffer), incubando-se a reação a 60°C por exatos 30 minutos, para a fragmentação do RNA. A fragmentação foi interrompida adicionando-se o tampão de hibridização (2X GE Hybridization Buffer HI-RPM). Finalmente, 100 µL de cada amostra foram colocadas nas lâminas contendo os microarranjos de oligonucleotídeos. As lâminas foram então condicionadas em forno de hibridização (Agilent G2545A Hybridization Oven) a 65°C por 17 horas. Finalmente, as lâminas foram lavadas de acordo com o manual do fabricante e escaneadas com o aparelho GenePix® 4000B microarray scanner (Molecular Devices, USA).

3.6.17.3 Análise das imagens e dados obtidos do *microarray* de *A. nidulans*

As imagens geradas através do escaneamento das lâminas de *microarray* foram analisadas utilizando-se o software Agilent Feature Extraction (FE), versão 9.5.3.1 (Agilent Technologies, USA), que faz uso do algoritmo de normalização por Lowess, obtendo-se a subtração do *background* e a normalização dos valores de intensidade da fluorescência de Cy-3 e Cy-5. Os dados normalizados pelo FE foram convertidos em novo formato de arquivo utilizando-se o software Express Converter (versão 2.1, TM4 platform disponível em <http://www.tm4.org/utilities.html>), que converte os arquivos Agilent em arquivos com extensão mev (de *multiple experiment viewer*), arquivos esses compatíveis com a plataforma TM4 para análise de expressão gênica. Os novos arquivos, agora com extensão .mev, foram carregados no software MIDAS (TM4 platform), onde foi calculada a média dos dados obtidos de genes replicados em cada *microarray*, a partir das duplicatas biológicas de cada tratamento. Finalmente, os dados completamente normalizados foram analisados através do software TIGR MeV (TM4 platform, Multi Experiment Viewer, disponível em <http://www.tigr.org/software/microarray.shtml>), por meio do qual os genes diferencialmente expressos entre o meio completo e o MM+avicel 1% (p/v) foram estatisticamente identificados, utilizando-se teste *t* ($p > 0.01$). Os genes diferencialmente expressos foram considerados significantes quando a razão do $\log_2$ da expressão (Cy3/Cy5) foi diferente de zero, que indica a ausência de modulação da expressão gênica. Os termos GO mais representados dentro da lista de genes

diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se o programa FetGOat (<http://www.broadinstitute.org/fetgoat/index.html>). A regulação diferencial da expressão gênica entre as três cepas após a transferência para MM+avicel 1% (p/v) foi determinada através da análise de Venn e o perfil funcional da lista de genes foi determinado utilizando-se a base de dados FunCats (http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_p130_Asp_nidul). As proteínas e enzimas hidrolíticas foram identificadas utilizando-se o programa TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) e a base de dados de enzima CAZy (<http://www.cazy.org/>). Os dados foram depositados em “National Center of Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE47810>).

3.6.18 Análise de expressão gênica de *A. niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido através de hibridações de *microarray*

3.6.18.1 Extração e manipulação de RNA para as hibridações de *microarray* em *A. niger*

1×10^6 conídios do fungo *A. niger* N402 foram inoculados em 30 mL de MM+frutose 1% (p/v) à 30°C por 24 horas, sendo este o controle dos experimentos. Após este tempo, lavou-se a cultura com 20 mL de água destilada estéril e transferiu-se a cultura para 30 mL de meio mínimo sem fonte de carbono contendo 0,5% (p/v) de bagaço explodido por 6, 12 e 24 horas. Após incubação, o micélio das culturas foi filtrado a vácuo em filtro Whatman número 1 (GE Healthcare, Grandview Blvd. Waukesha, WI, USA), lavado exaustivamente com água destilada e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), segundo instruções do fabricante e purificados utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen), segundo as especificações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001), tendo como critério a presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e

18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda. Os RNAs foram quantificados utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.6.18.2 Marcação e hibridização dos RNAs e geração das imagens de *microarray*

A construção das lâminas do microarray foi realizada através da ferramenta Agilent technologies eArray software (<http://earray.chem.agilent.com/earray/>; Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA. 14.086 sequências de genes representando o genoma da cepa *A. niger* CBS513.88 foram escolhidas. O número de cada “ORF” foi validado através da comparação das sequências depositadas em três bancos de dados (CADRE (The Central Aspergillus resource), JGI (Joint Genome Structure) e Instituto Broad) com o objetivo de identificação e validação das sequências para o desenho das lâminas. Embora algumas diferenças no tamanho e número das sequências detectadas, foi possível identificar 14.086 “ORFs”, as quais foram então utilizadas na ferramenta eArray baseado nos parâmetros implementados nesta ferramenta, 14.052 genes foram utilizados para o desenho das lâminas. Esses genes estão representados três vezes nas lâminas e a anotação baseada no trabalho de Pel et al. (2007) foi utilizada para gerar o arquivo de anotação utilizado nessa análise. Portanto, as lâminas de microarray compreendem 45.220 características representadas em 1.417 controles internos do eArray e 600 controles internos representando 60 “ORFs” escolhidas randomicamente (10 replicatas).

Para a análise de genes diferencialmente expressos na cepa N402 de *A. niger* durante indução em bagaço de cana explodido por 6, 12 e 24 horas, utilizou-se a medição da expressão gênica através de procedimento de *microarray*. Este procedimento foi realizado utilizando-se lâminas customizadas contendo os oligonucleotídeos de interesse (modelo 4 X 44K microarray) da Agilent Technologies, baseada na anotação do genoma de *A. niger* disponível.

Os RNAs extraídos dos micélios e purificados foram marcados com cianina-3 ou cianina-5, Cy-3- ou Cy-5-dUTP, respectivamente, utilizando-se o kit Two-Color Microarray-based gene expression analysis (Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies™, USA), de acordo com o manual do fabricante.

Inicialmente, o RNA total das amostras (5µg) foi incubado com os controles internos do kit, na diluição adequada (RNA Spike A ou B). Após, foi realizada a síntese de cDNA, incubando-se as amostras na presença do primer T7 promoter. A desnaturação do primer foi realizada a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado à reação o cDNA Master Mix (5X First Strand Buffer, DTT 0,1 M, dNTP mix 10 mM, MMLV-RT e RNaseOut). Esta mistura foi incubada a 40°C por 2 horas para síntese de cDNA, sendo posteriormente colocada a 70 °C por 15 minutos. A seguir foi realizada a síntese de cRNA, adicionando-se às amostras o mix do fabricante (Agilent™ Transcription Master Mix, contendo 4X Transcription Buffer, DTT 0,1 M, NTP mix , 50% PEG, RNaseOut, pirofosfatase inorgânica e T7 RNA polymerase). À esta mistura foram adicionados os marcadores Cy-3 nas amostras controle (frutose 16h) ou Cy-5 nas amostras induzidas em BE. Para a síntese de cRNA marcado as reações foram incubadas a 40°C por 2 horas. O cRNA marcado foi finalmente purificado utilizando-se o kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) e quantificados através do NanoDrop® 2000 Thermo Scientific (Uniscience).

Para a hibridização, foram misturados 825 ng de cada cRNA das amostras marcadas com Cy-3 (controles) com 825 ng de cRNA marcado com Cy-5 (indução). À mistura foi adicionado o Agilent™ Fragmentation Mix (10X Blocking agent, 25X fragmentation buffer), incubando-se a reação a 60°C por exatos 30 minutos, para a fragmentação do RNA. A fragmentação foi interrompida adicionando-se o tampão de hibridização (2X GE Hybridization Buffer HI-RPM). Finalmente, 100 µL de cada amostra foi colocada nas lâminas contendo os microarranjos de oligonucleotídeos. As lâminas foram então condicionadas em forno de hibridização (Agilent G2545A Hybridization Oven) a 65 °C por 17 horas. Finalmente, as lâminas foram lavadas de acordo com o manual do fabricante e escaneadas com o aparelho GenePix® 4000B microarray scanner (Molecular Devices, USA).

3.6.18.3 Análise das imagens e dados obtidos do *microarray* de *A. niger*

As imagens geradas através do escaneamento das lâminas de microarranjo foram analisadas utilizando-se o software Agilent Feature Extraction (FE), versão 9.5.3.1 (Agilent Technologies, USA), que faz uso do algoritmo de normalização por Lowess, obtendo-se a subtração do *background* e a normalização dos valores de intensidade da fluorescência de Cy-3 e Cy-5. Os dados normalizados pelo FE foram

convertidos em novo formato de arquivo utilizando-se o software Express Converter (versão 2.1, TM4 platform disponível em <http://www.tm4.org/utilities.html>), que converte os arquivos Agilent em arquivos com extensão .mev (de *multiple experiment viewer*), arquivos esses compatíveis com a plataforma TM4 para análise de expressão gênica. Os novos arquivos, agora com extensão .mev, foram carregados no software MIDAS (TM4 platform), onde foi calculada a média dos dados obtidos de genes replicados em cada microarranjo, a partir das duplicatas biológicas de cada tratamento. Finalmente, os dados completamente normalizados foram analisados através do software TIGR MeV (TM4 platform, Multi Experiment Viewer, disponível em <http://www.tigr.org/software/microarray.shtml>), por meio do qual os genes diferencialmente expressos foram estatisticamente identificados, utilizando-se teste t ($p > 0.001$). Os genes diferencialmente expressos foram considerados significantes quando a razão do $\log_2$ da expressão (Cy3/Cy5) foi diferente de zero, que indica a ausência de modulação da expressão gênica. Os dados foram depositados em “National Center of Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database [GEO:GSE24798] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24798>.

Para calcular o FDR utilizou-se o método baseado na distribuição de mistura descrito por Allison et al (2002). Esse método foi implementado utilizando-se o software estatístico GenStat (VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK) com valores de p como entrada e FDR (valores de p corretos) correspondente a cada valor de p que foi gerado (Tabela Suplementar 1). Esse teste gera um grande número de valores significantes, os quais sob H_0 (hipótese inicial), apresentam uma distribuição uniforme e sob hipótese alternativa podem ser modelados como densidade β ou γ truncada. A estatística da mistura de distribuição estimou os parâmetros da mistura de distribuição para derivar o FDR. Maiores informações podem ser obtidas em “GenStat for Analysis of Microarray Data guide (<http://www.vsnl.co.uk/downloads/genstat/release14/doc/Microarray-Guide.pdf>).

3.6.19 Extração e manipulação de proteínas para análise do secretoma de *A. niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido

Para a obtenção de proteínas, o sobrenadante da cultura de *A. niger* foi obtido através da indução da cepa N402 em 30 mL de MM contendo 0,5% (p/v) de bagaço

explodido por 24 horas à 30°C. Após este sobrenadante foi liofilizado e ressuspendido em 50 µl de água destilada. Para separação das proteínas secretadas no sobrenadante foi realizada eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida utilizando o sistema NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini-Gels, de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Um volume de 50 µL de amostra foi misturado ao tampão 4X NuPAGE® LDS Sample buffer, aquecidos a 70°C por 10 minutos e aplicados no gel. A corrida foi realizada a 125 mA em presença de tampão 1X SDS Running Buffer, preparado a partir da diluição de NuPAGE® MES (20X). Para a visualização das bandas correspondentes às proteínas secretadas foi utilizado o corante compatível com espectrômetro de massa, Mass Spec-compatible Comassie® Brilliant Blue G-250 (USB Corporation, Ohio, USA). O gel foi lavado com ácido acético 1% para visualização e processamento para as análises de espectrometria de massa

3.6.20 Espectrometria de massa por MALDI-TOF

As bandas selecionadas do gel foram digeridas com tripsina (Sequencing-Grade Modified Trypsin, Promega), como descrito anteriormente (Parodi-Talice et al, 2004). Os peptídeos foram extraídos do gel utilizando-se acetonitrila 60% em ácido trifluoroacético (TFA) 0,2%. Após foram concentrados por secagem a vácuo e dessalinizados utilizando-se microcolunas de fase reversa C-18 (OMIX Pippete tips, Varian). A eluição dos peptídeos foi feita diretamente em placas próprias para uso em espectrômetro de massa, em 3 µL de solução matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 60% de acetonitrila aquosa, contendo TFA 0,2%).

Os espectros de massa foram adquiridos no instrumento MALDI-TOF/TOF 4800 (ABi Sciex) em modo refletor e foram externamente calibrados utilizando-se uma mistura de peptídeos padrão. A dissociação induzida por colisão (MS/MS) dos peptídeos selecionados também foi realizada. As proteínas foram identificadas através de busca em banco de dados por meio de valores de m/z de peptídeos, utilizando-se o programa MASCOT, de acordo com os seguintes parâmetros: tolerância de massa monoisotópica de 0,05 Da; tolerância de massa do fragmento, 0,3 Da; oxidação de metionina como variável e tolerância de uma clivagem de tripsina perdida. Apenas scores de proteínas maiores do que 85 foram considerados significantes ($p < 0.05$).

3.6.21 Estoque de linhagens

As linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho foram estocadas em sílica estéril a temperatura ambiente, de acordo com a metodologia descrita pelo Fungal Genetics Stock Center (<<http://www.fgsc.net/methods/fgscpres.html>>). As linhagens de bactérias e leveduras foram estocadas em glicerol 40% (v/v) a -80°C, de acordo com Sambrook; Russel (2001).

3.6.22 Análise estatística

Todos os testes estatísticos de significância foram determinados através do *t*-test uni-caudal.

4. Resultados e Discussão

Módulo 4.1: Análise do transcriptoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido

Artigo: Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. De Souza, W.R*; Gouvêa, P.F*; Savoldi, M.; Malavazi, I.; Bernardes, L.A.S.; Goldman, M.H.S.; de Vries, R.P.; Oliveira, J.V.C.; Goldman, G.H. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4(40), 2011.

(*) These authors contributed equally to this work.

4.1.1 Análise do crescimento de *A. niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido

Para o entendimento de como melhorar coquetéis enzimáticos que podem hidrolisar bagaço de cana pré-tratado, utilizou-se uma abordagem genômica para investigar quais genes e vias são transcricionalmente moduladas durante o crescimento de *A. niger* em bagaço de cana proveniente do tratamento por explosão, chamado de bagaço de cana explodido (BE). Primeiramente foi realizado um experimento de microscopia de campo claro com o bagaço explodido. Os conídios de *A. niger* foram incubados em tubos de 1,5 ml contendo 1 mL de MM sem fonte carbono e MM sem fonte de carbono adicionado de 0,5% (p/v) de BE por 24 horas à 30⁰C sob agitação de 200 rpm. Como pode-se observar os fragmentos de BE não são muito regulares no tamanho (Figura 13 A, painel da esquerda). Após 24 horas do inóculo do fungo em meio líquido mínimo sem fonte de carbono, contendo somente 0,5% (p/v) de bagaço explodido, pode-se observar o crescimento íntimo deste nos fragmentos de bagaço explodido (Figura 13 A e B).

Figura 13 - Crescimento do fungo *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar explodido (BE). *A. niger* foi crescido em meio mínimo complementado com 0,5% (p/v) de bagaço explodido (BE) como fonte de carbono por 24 horas a 30°C. **(A)** Fragmentos de bagaço de cana explodido corados com Azul de Toluidina 0,05% sem inóculo do fungo (painel da esquerda) e inoculado com *A. niger* com crescimento de 24 horas a 30°C (painel da direita). **(B)** Ampliação do bagaço de cana explodido inoculado com *A. niger* por 24 horas a 30°C. 20 µm.

4.1.2 Determinação da atividade de celulase e xilanase em *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido

Como um primeiro passo para verificar a produção de celulases e hemicelulases em *A. niger* foi realizado um experimento de cinética da atividade de xilanase e celulase (Figura 14). A atividade de xilanase foi maior em xilana 1% do que em qualquer outra das três fontes de carbono. Em bagaço sem tratamento não houve atividade desta enzima (Figura 14 A). A atividade de celulase foi maior em bagaço explodido do que em qualquer outras das três fontes de carbono (Figura 14 B). A atividade de celulase foi muito maior na presença de xilose do que na presença de xilana (Figura 14 B, painel acima). Como esperado, o tratamento físico do bagaço, o bagaço explodido (BE), aumentou a atividade de celulase e xilanase (Figura 14 painel abaixo). Curiosamente, durante o crescimento em BE, a atividade de celulase e xilanase permaneceu aproximadamente no mesmo nível nos tempos entre 6 e 36 horas, sendo que somente a atividade de celulase aumentou em 48 horas de incubação (Figura 14, painel abaixo). Desta forma, decidiu-se escolher os pontos de 6, 12 e 24 horas para a realização dos experimentos de hibridações de *microarrays* com o objetivo de se entender os eventos precoces envolvidos na indução de celulases e xilanases.

A.

B.

Figura 14 - Atividade enzimática de (A) xilanase e (B) celulase na presença de xilose 1%, xilana 1% e bagaço de cana-de-açúcar não explodido e explodido. A frutose foi utilizada como fonte de carbono para o controle (0h). Xilose e xilana 1% (p/v) e bagaço de cana, explodido (BE) ou não (BNE) a 0,5% (p/v), foram utilizados como fontes de carbono, durante os tempos indicados nas figuras. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima requerida para degradar 1 μ M de açúcar reduzido de xilose equivalentes por um minuto a partir de arabinoxilana em pH 4,5 e 40°C. Os resultados são a média de três repetições e as barras de erros representam o desvio padrão.

4.1.3 Identificação de genes modulados em *A. niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido através de hibridações de *microarray*

Para obter-se uma visão sobre genes que codificam enzimas hidrolíticas e vias que são influenciadas durante o crescimento em BE, determinou-se o perfil transcricional de *A. niger* através do experimento de hibridações de *microarray*. O foco principal foi em genes que teriam a sua expressão de mRNA aumentada ou diminuída quando o fungo fosse crescido em bagaço explodido comparando-se com o controle (frutose 1%). As hibridações revelaram cerca de 3.700 genes modulados em pelo menos um tempo experimental (1.555 e 2.143 genes com $\log_2$ Cy5/Cy3 relação ≥ 1 e ≤ -1 , respectivamente; GEO: GSE24798] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24798>). Esses genes estão envolvidos em uma variedade de processos celulares e foram classificados em um catálogo funcional (FunCat) que engloba categorias de banco de dados <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB> (Tabela Suplentar 2). A realização da clusterização hierárquica permitiu mostrar a distribuição desses genes, os quais estão distribuídos em seis grupos principais (Figura 15 A). Os três primeiros grupos de (C1 a C3; $n = 2.143$ genes) (Figura 15 A) mostraram os níveis de expressão mais baixos em bagaço explodido. A análise FunCat desses genes classificados nesses três primeiros grupos mostrou um enriquecimento significativo ($p < 0.001$) para (1) crescimento celular e morfogênese, (2) montagem de complexos protéicos, (3) membrana plasmática eucariótica e (4) degradação de compostos exógenos (Figura 15 B). Se os genes não classificados não fossem levados em consideração, as categorias “crescimento celular e morfogênese” e “montagem de complexos protéicos” compreenderiam respectivamente 52% e 34% desses grupos de genes (Figura 15 B). Na categoria “crescimento celular e morfogênese” foram encontrados genes envolvidos em progressão do ciclo celular, como aqueles que codificam ciclinas (An01g07040, An15g06500 e An07g08520) e quinases dependentes de ciclina (An05g00280 e An09g04660). Além disso, muitos genes codificadores de proteínas Ras (An14g05530, An11g10320, An15g06650 e An5g00370) e de proteínas de transdução de sinal envolvidas no crescimento celular e monitoramento de nutrientes foram expressos (proteínas G como An2g08000 e An2g01290), assim como proteínas quinases como “mitogen-activated” An08g03240 e a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (An7g05060). Esses resultados

sugerem que existe uma redução na progressão do crescimento durante a incubação de *A. niger* em 24 horas com BE.

Os outros grupos de genes (C3 a C6; $n = 1.555$ genes) (Figura 15 A) mostraram os maiores níveis de expressão em bagaço explodido. A análise FunCat (RUEPP et al., 2004) dos genes classificados nesses grupos mostrou um enriquecimento em (1) metabolismo de compostos C e carboidratos, (2) metabolismo de lipídios, ácidos graxos e isopropenóides, (3) morte celular, (4) detoxificação, (5) fermentação, (6) via pentose fosfato, (7) diferenciação celular e (8) biogênese ribossômica (Figura 15 C). Mais uma vez, se os genes não classificados não fossem levados em consideração, as categorias “metabolismo de compostos C e carboidrato”, “fermentação” e “via pentose fosfato” compreenderiam 50,36% desses grupos de genes (Figura 15 C). As categorias “metabolismo de lipídios, ácidos graxos e isopropenóides” e “detoxificação” compreenderiam 25,18% e 15,28% desses grupos de genes, respectivamente (Figura 15 C).

Figura 15 - Clusterização hierárquica comparando-se o padrão de expressão de *A. niger* crescido em bagaço de cana explodido. (A) O código de cores representa a razão de $\log_2$ entre cianina 5 e cianina 3 (razão Cy5/Cy3) para cada ponto de tempo com Cy₃ utilizado como valor de referência (ponto de tempo = 0, crescimento em frutose). Os dados significantes resultantes foram visualizados baseados em vetores de expressão semelhantes utilizando-se clusterização hierárquica e distância Euclideana com uma média do método de agrupamento para visualização de todos os grupos de dados. Clusters C1 a C3 e C4 a C6 demonstram genes com diminuição e aumento do acúmulo de seu mRNA, respectivamente, durante o crescimento de *A. niger* em bagaço de cana explodido. **(B)** e **(C)** Dados do catálogo funcional (FunCat) <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/> (Ruepp et al., 2004) – Anotação funcional para as proteínas codificadas encontradas nos clusters C1 a C6.

Após esta clusterização, foi realizada uma busca por genes que codificam celulasas e xilanases que tiveram um aumento no acúmulo de seu mRNA quando *A. niger* foi crescido em BE (Tabelas 8 e 9). O genoma de *A. niger* compreende respectivamente 31 e 36 genes preditos que codificam celulasas e hemicelulasas (PEL et al., 2007). Durante o crescimento em BE observou-se um aumento na expressão de 18 (58%) e 21 (58%) genes que codificam celulasas e hemicelulasas (Tabelas 8 e 9). Ocorreu também um aumento no acúmulo de mRNA de vários genes envolvidos em fermentação, como álcool desidrogenase (*A/cB*; An01g12170) e lactato desidrogenase (*Ldh*; An11g09520), aumentando a possibilidade de que a fermentação lática e alcoólica ocorram concomitantemente com a sacarificação da biomassa. Como esperado, há também uma intensa modulação de vários genes envolvidos no metabolismo de compostos C e carboidratos e também na via da pentose fosfato, o que reflete a ampla metabolização e transporte de diferentes classes de açúcares durante a utilização da biomassa.

Tabela 8 – Genes preditos de *A. niger* que codificam celulasas que tiveram aumento do acúmulo de mRNA durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido quando comparado com o crescimento em frutose (controle de referência).

“Locus Gene”	Motivo*			Família GH	PS	EM	Descrição	Relação log ₂ Cy5/Cy3**		
	Sequência	Localização	Orientação					6 horas	12 horas	24 horas
An03g03740				GH 1	Não	Não	β-glicosidase (bgl4)	4.22	3.53	4.04
An11g02100	GGCTAG	249	1	GH 1	Sim	Não	β-glicosidase			
An15g04800	TTAGCC	-178	-1	GH 3	Sim	Não	β-1.2-D-glicosidase (b2tom)	1.90	0.37	1.85
An07g07630	GGCTAA	-180	1	GH 3	Sim	Não	β-glicosidases	4.88	3.67	3.21
An17g00520				GH 3	Não	Não	Precursor β-glicosidase (bgluc)	5.34	5.49	5.23
An18g03570				GH 3	Sim	Sim	β-glicosidase (bgl1)	6.06	3.55	4.31
An11g00200				GH 3	Sim	Não	β-glicosidase (bglN)	6.23	5.34	5.94
An11g06090	CTAGCC GGCTAA	- 69 - 482	-1 1	GH 3	Sim	Não	β-glicosidase2 (bgl2)	5.44	4.62	3.19
An03g01050				GH 5	Sim	Não	Endo-β-1.4-glucanase	3.75	0.92	2.58
An01g11670				GH 5	Sim	Não	Endo-β-1.4-glucanase A (egla)	6.25	6.97	6.86
An07g08950	GGCTAA	-128	1	GH 5	Sim	Não	Endo-β-1.4-glucanase B	8.21	8.03	8.16
An08g01760	TTAGCC	-185	-1	GH 6	Sim	Não	Exocelobiohidrolase	5.07	3.47	2.73
An12g02220				GH 6	Sim	Sim	Celulose 1.4-β-celobiosidase II (cbh2)	6.03	6.15	7.36
An07g09330				GH 7	Sim	Não	Precursor 1.4-β-D-glucana celobiohidrolase A (cbha)	5.95	5.83	3.89
An01g11660	GGCTAG TTAGCC	- 417 -157	1 1	GH 7	Sim	Não	Precursor 1.4-β-D-glucana celobiohidrolase B (cbhb)	7.43	6.91	6.58
An14g02760				GH 12	Sim	Não	Endoglucanase A (eglA)	7.88	6.85	6.35
An12g04610				GH 61	Sim	Não	Similar a endoglucanase IV (egl4)	6.78	6.40	6.59
An01g01870	GGCTAA	-394	1	GH 74	Sim	Não	Avicelase III	4.69	4.52	4.15

GH: glicosideo hidrolase; **PS:** peptideo sinal; **EM:** espectrometria de massa; **Relação log₂ Cy5/Cy3:** Relação logarítmica na base 2 de cianina 5 e cianina 3. *Resultados da busca de regiões promotoras (500 pares de bases antes do códon de início traducional putativo) de genes indicados para o sítio de ligação ao XlnR de *A. niger* contendo a região 5'- TTAGCC – 3' ou 5'- GGCTAG – 3'. Localização é relativa ao códon de início. ** A razão log₂ Cy5/Cy3 observada nas hibridações de *microarray*. Na coluna “Orientação” os números que foram perdidos são os mesmos.

Tabela 9 - Genes preditos de *A. niger* que codificam hemicelulases que tiveram aumento do acúmulo de mRNA durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido quando comparado com o crescimento em frutose (controle referência).

“Locus Gene”	Motivo*			Família GH	PS	EM	Descrição	Relação log ₂ Cy5/Cy3**		
	Sequência	Localização	Orientação					6 horas	12 horas	24 horas
An12g01850				GH 2	Não		β-manosidase	2.03	1.63	1.01
An01g09960	GGCTAA	-147 -133	1	GH 3	Sim	Não	Exo-1,4-β-xilosidase (<i>xlnD</i>)	6.70	5.85	5.51
An17g00300	TTAGCC	-487 -9	-1	GH 3	Sim	Não	Bifuncional xilosidase-arabinosidase (<i>xarB</i>)	7.04	6.42	4.80
An03g00940	GGCTAA	-495 288	1	GH10	Sim	Sim	Precursor Endo-1.4-β-xilanase A (<i>xynA</i>)	6.77	5.86	5.52
An01g14600				GH 11	Sim	Não	Endo-1.4-β-xilanase	1.88	1.66	2.17
An15g04550	GGCTAA TTAGCC	-322 270	1 -1	GH 11	Sim	Não	Xilanase A (<i>xynA</i>)	6.21	6.21	6.19
An01g00780	GGCTAA	-216 124	1	GH 11	Sim	Sim	Endo-1.4-β-xilanase B (<i>xynB</i>)	8.86	8.36	8.24
An01g03340	GGCTAA	-244	1	GH 12	Sim	Não	Xiloglucana-especifica endo-β-1.4-glucanase	5.79	5.29	5.05
An14g01800				GH 27	Sim		α-galactosidase D	3.01	1.63	1.23
An06g00170				GH 27	Sim		α-galactosidase A	3.25	2.57	5.62
An02g11150				GH 27	Sim	Não	α-galactosidase (<i>aglB</i>)	4.16	2.00	1.38
An11g03120				GH 43	Não	Não	Endo-1.4-β-xilanase (<i>xynD</i>)	2.09	1.70	1.95
An02g00140				GH 43	Não	Não	Xilana 1.4-β-xilosidase (<i>xynB</i>)	2.88	1.43	1.34
An09g01190				GH 43	Sim	Não	Endo 1.5-α-arabinanase (<i>abnA</i>)	6.54	4.31	4.78
An08g01710				GH 51	Não	Não	α-L-arabinofuranosidase (<i>abfA</i>)	5.69	2.66	4.38
An15g02300	CTAGCC TTAGCC	-39 - 473 -421	-1 -1	GH 54	Sim	Não	Arabinofuranosidase B (<i>abfB</i>)	7.94	3.43	2.49
An03g00960	GGCTAA	-346	1	GH 62	Sim	Não	1.4-β-D-arabinoxilana Arabinofuranohidrolase (<i>axhA</i>)	6.13	6.05	6.00
An14g05800	GGCTAG GGCTAA	-412 -277	1	GH 67	Sim	Não	α-glucuronidase água	9.12	8.36	7.72

“Locus Gene”	Motivo*			Família GH	PS	EM	Descrição	Relação log ₂ Cy5/Cy3**		
	Sequência	Localização	Orientação					6 horas	12 horas	24 horas
An16g02760	GCCTAA	-245	1	GH95	Não	Não	α-fucosidase			
An12g02550	TTAGCC	-500	-1	CE 1	Sim	Não	Feruloil esterase	7.18	7.24	7.87
An12g05010				CE 1	Sim	Não	Acetil xilana esterase (<i>axeA</i>)	8.31	7.72	7.77

GH: glicosídeo hidrolase; **PS:** peptídeo sinal; **EM:** espectrometria de massa; **Relação log₂ Cy5/Cy3:** Relação logarítmica na base 2 de cianina 5 e cianina 3.*Resultados da busca de regiões promotoras (500 pares de bases antes do códon de início traducional putativo) de genes indicados para o sítio de ligação ao XlnR de *A. niger* contendo a região 5'- TTAGCC – 3' ou 5'- GGCTAG – 3'. Localização é relativa ao códon de início. ** A razão log₂ Cy5/Cy3 observada nas hibridações de *microarray*. Na coluna “Orientação” os números que foram perdidos são os mesmos.

4.1.4 Validação das análises das hibridações de *microarray* por RT-PCR em tempo real

4.1.4.1 Genes que codificam celulasas e xilanases

Para validar alguns dados do *microarray*, foram escolhidos oito diferentes genes das análises deste experimento que mostraram aumento no acúmulo de mRNA quando *A. niger* foi crescido em BE. Primers Lux fluorescentes foram desenhados utilizando a “open read frame” (ORF) de cada gene de interesse e utilizados para quantificar sua expressão em *A. niger* crescido em BE por 6, 12 e 24 horas (Tabela 10). A quantidade medida de mRNA de cada gene específico em cada uma das amostras tratadas foi normalizado utilizando-se os valores da limiar comparativa (Ct) obtidos para a amplificação de mRNA de actina corridos em uma mesma placa. A β -tubulina também foi utilizada como normalizador e foram observados os mesmos resultados (dados não apresentados). Os resultados foram expressos em número de vezes que os genes apresentaram aumento na expressão quando *A. niger* foi crescido em BE em comparação com o controle, crescido em frutose. Os genes escolhidos para validação dos dados foram *xlnD* (An1g0960) que codifica uma exo-1,4- β -xilosidase, *xynB* (An01g00780) que codifica uma endoglucanase, *eglB* (An07g08950) que codifica uma endoglucanase, *cbhA* (An07g09330) que codifica uma celobiohidrolase e *cbhB* (An01g11660) que codifica uma outra celobiohidrolase. Os genes *xyrA* (An01g03780) e *XlnR* (An15g05810), os quais codificam respectivamente uma xilose redutase e o principal fator de transcrição responsável pela indução de celulasas e xilanases em *A. niger*, também foram escolhidos para a validação. Ambos os genes mostraram uma expressão maior durante o crescimento em BE na análise das hibridações (Tabela Suplementar 3). Todos os genes testados mostraram aumento no acúmulo de mRNA no ponto de 6 horas sendo que em 12 e 24 horas o acúmulo destes genes diminuiu. Entretanto, todos esses genes mostraram, em diferentes magnitudes, aumento no acúmulo de mRNA quando *A. niger* foi crescido em BE comparando-se com o controle (Tabela 10). Desta forma, as hibridações de *microarray* do fungo *A. niger* foram capaz de proporcionar informações sobre a modulação da expressão de genes com um considerável nível de confiança.

Tabela 10 – Expressão gênica medida por RT- PCR em tempo real de genes que codificam celulases, hemicelulases, xilose redutase e *xlnR* de *A. niger* durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.

Gene e "locus"	Controle (frutose)	Bagaço explodido 6 horas	Bagaço explodido 12 horas	Bagaço explodido 24 horas
<i>cbhA</i> (An07g09330)	0.0086 ± 0.0008	0.3178 ± 0.0104	0.0477 ± 0.0013	0.0284 ± 0.0066
<i>cbhB</i> (An01g11660)	0.0023 ± 0.0000	4.2126 ± 0.1298	1.2376 ± 0.0629	1.6419 ± 0.3598
<i>eglA</i> (An01g11670)	0.0008 ± 0.0000	1.4762 ± 0.2621	0.7261 ± 0.0368	0.3397 ± 0.0740
<i>eglB</i> (An07g08950)	0.0062 ± 0.0004	3.7060 ± 0.0112	0.6213 ± 0.0248	0.1227 ± 0.0263
<i>xynB</i> (An01g00780)	0.0039 ± 0.0001	153.0746 ± 2.8399	9.8474 ± 0.6560	6.4386 ± 1.5611
<i>xlnD</i> (An01g09960)	0.0110 ± 0.0003	15.4472 ± 0.1495	0.7838 ± 0.0036	0.0617 ± 0.0149
<i>xlnR</i> (An15g05810)	0.76 ± 0.00	5.93 ± 0.62	1.71 ± 0.06	2.35 ± 0.24
<i>xyrA</i> (An01g03780)	0.33 ± 0.02	268.58 ± 6.22	45.84 ± 1.98	36.40 ± 1.11

O acúmulo de mRNA de vários genes em *A. niger* durante o crescimento em BE. As culturas foram crescidas por 24 horas a 30°C em MM+frutose 1% e o micélio foi transferido para MM+ 0,5 % (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar explodido e crescido por 6, 12 e 24 horas a 30°C. RT-PCR em tempo real foi utilizado para quantificar o mRNA. A quantidade medida de mRNA de cada gene específico em cada uma das amostras tratadas foi normalizada utilizando-se os valores do limiar comparativo (C_T) obtidos para a amplificação do mRNA de actina na mesma placa. A quantificação relativa da expressão de um gene específico e da actina foi determinada por uma curva padrão (por exemplo, C_T –valores plotados contra o logaritmo do número de cópias do DNA). Resultados de quatro grupos de experimentos foram combinados para cada determinação. Os dados mostrados são média ± desvio padrão. Os valores representam a concentração de cDNA de um gene específico dividido pela concentração do cDNA de actina.

4.1.4.2 Genes que codificam transportadores

Nas hibridações de *microarray* também foi observada uma intensa modulação do acúmulo de mRNA de genes que codificam potenciais transportadores de açúcar (Tabela Suplementar 3). Sete destes genes que apresentaram aumento do acúmulo de mRNA quando o fungo foi crescido em BE foram escolhidos para posteriores análises e validação do *microarray* (Tabela 11). Como um primeiro passo para compreender a função destes genes, realizou-se um experimento de RT-PCR em tempo real. Primers Lux fluorescentes novamente foram desenhados utilizando a “open reading frame” (ORF) de cada gene de interesse e utilizados para quantificar sua expressão em *A. niger* crescido em BE por 6, 12 e 24 horas. O acúmulo de mRNA de tais genes em presença de BE também demonstrou um aumento no RT-PCR em tempo real, assim como nas hibridações de *microarray*, desta forma, validando mais uma vez o *microarray* (Tabela 12).

Tabela 11 - Genes preditos de *A. niger* que codificam transportadores que tiveram aumento do acúmulo de mRNA durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido quando comparado com o crescimento em frutose (controle referência).

Gene “locus”	Motivos*			Descrição	Relação log ₂ Cy5/Cy3**		
	Sequência	Localização	Orientação		6 horas	12 horas	24 horas
An01g00850	CTAGCC GGCTAA	-376 -385	-1 1	Similaridade a xilose permease (<i>xyt1</i>)	4.04	3.91	3.79
An06g00260	CTAGCC	-49	-1	Altamente similar ao transportador de hexose (<i>hxt5</i>)	5.87	4.36	6.23
An06g00620				Altamente similar ao simporter α-glicosídeo-hidrogênio (<i>mal11</i>)	7.19	4.73	5.96
An11g03700				Altamente similar ao transportador de hexose (<i>hxt1</i>)	1.33	1.97	2.64
An12g09270	GGCTAA	-356	1	Altamente similar a lactose permease (<i>lac12</i>)	3.52	4.44	2.94
An14g01600				Altamente similar ao transportador de hexose (<i>hxtA</i>)	6.33	3.66	4.94
An15g04270				Altamente similar a proteína de transporte quinato (<i>qutD</i>)	5.07	6.02	8.29
An15g05440	TTAGCC	-6	-1	Altamente similar ao transportador de alta afinidade de glicose (<i>hgt1</i>)	3.85	3.02	2.86

Relação log₂ Cy5/Cy3: Relação logarítmica na base 2 de cianina 5 e cianina 3. *Resultados da busca de regiões promotoras (500 pares de bases antes do códon de início traducional putativo) de genes indicados para o sítio de ligação ao XlnR de *A. niger* contendo a região 5'- TTAGCC – 3' ou 5'- GGCTAG – 3'. Localização é relativa ao códon de início. ** A razão log₂ Cy5/Cy3 observada nas hibridações de *microarray*.

Tabela 12 – Expressão gênica medida por RT-PCR em tempo real de genes que codificam transportadores de *A. niger* durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.

Gene	Controle (frutose)	Bagaço explodido 6 horas	Bagaço Explodido 12 horas	Bagaço explodido 24 horas
An01g00850	0.064 ± 0.007	1.41 ± 0.01	1.38 ± 0.29	0.10 ± 0.02
An02g11260	0.21 ± 0.03	0.89 ± 0.09	1.70 ± 0.030	0.22 ± 0.002
An06g00260	2.25 ± 0.25	8.96 ± 0.93	8.87 ± 1.15	1.49 ± 0.19
An11g03700	0.0396 ± 0.0017	2.49 ± 0.08	3.02 ± 0.32	0.094 ± 0.019
An12g09270	0.96 ± 0.08	23.40 ± 3.50	4.28 ± 0.64	3.17 ± 0.61
An15g04270	0.036 ± 0.004	0.037 ± 0.006	0.13 ± 0.02	0.110 ± 0.009
An15g05440	0.021 ± 0.004	0.071 ± 0.002	0.041 ± 0.007	0.003 ± 0.001

O acúmulo de mRNA de vários genes em *A. niger* durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido. As culturas foram crescidas por 24 horas a 30°C em MM+frutose 1% (p/v) e o micélio foi transferido para MM+ 0,5% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar explodido e crescido por 6, 12 e 24 horas a 30°C. RT-PCR em tempo real foi utilizado para quantificar o mRNA. A quantidade medida de mRNA de cada gene específico em cada uma das amostras tratadas foi normalizada utilizando-se os valores do limiar comparativo (C_T) obtidos para a amplificação do mRNA de actina na mesma placa. A quantificação relativa da expressão de um gene específico e da actina foi determinada por uma curva padrão (por exemplo, C_T – valores plotados contra o logaritmo do número de cópias do DNA). Resultados de quatro grupos de experimentos foram combinados para cada determinação. Os dados mostrados são média ± desvio padrão. Os valores representam a concentração de cDNA de um gene específico dividido pela concentração do cDNA de actina.

Um outro objetivo foi identificar genes que codificam transportadores de açúcar que poderiam estar envolvidos no transporte de xilose. Um experimento de RT-PCR em tempo real foi realizado com estes mesmos genes que codificam transportadores de açúcar, para observar se o acúmulo de mRNA destes genes seria modulado por xilose e afetado por glicose (Tabela 13). Todos os sete genes foram induzidos por xilose e reprimidos por glicose em diferentes magnitudes (Tabela 13). Juntos esses resultados sugerem que a identificação de genes que codificam transportadores de açúcar em *A. niger*, os quais foram baseados no seus perfis de expressão, podem ser promissores candidatos a transportadores de xilose.

Tabela 13 – Expressão gênica medida por RT-PCR em tempo real de genes que codificam transportadores de *A. niger* em presença de xilose ou xilose + glicose.

Gene “locus”	Controle (frutose)	Xilose 1 hora	Xilose 4 horas	Xil+Gli 1 hora	Xil+Gli 4 horas
An06g00620	0.08 ± 0.03	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.05	0.003 ± 0.00	0.03 ± 0.01
An15g04270	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
An15g05440	0.34 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.56 ± 0.12	0.09 ± 0.05	0.19 ± 0.05
An11g03700	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.009 ± 0.001	0.05 ± 0.01
An12g09270	0.29 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.10 ± 0.001	0.20 ± 0.05
An01g00850	0.25 ± 0.10	0.16 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.45 ± 0.17
An06g00260	0.70 ± 0.03	2.40 ± 0.22	2.30 ± 0.64	0.25 ± 0.01	0.36 ± 0.07

O acúmulo de mRNA de vários genes que codificam transportadores em *A. niger* durante o crescimento em MM+xilose (p/v) ou MM+xilose+glicose (p/v). As culturas foram crescidas por 24 horas a 30°C em MM+frutose 1% (p/v) e o micélio foi transferido para MM+xilose 1% (p/v) ou MM+xilose 1% + glicose 2% (p/v) e crescido por 1 ou 4 horas a 30°C. RT-PCR em tempo real foi utilizado para quantificar o mRNA. A quantidade medida de mRNA de cada gene específico em cada uma das amostras tratadas foi normalizada utilizando-se os valores do limiar comparativo (C_T) obtidos para a amplificação do mRNA de actina na mesma placa. A quantificação relativa da expressão de um gene específico e da actina foi determinada por uma curva padrão (por exemplo, C_T –valores plotados contra o logaritmo do número de cópias do DNA). Resultados de quatro grupos de experimentos foram combinados para cada determinação. Os dados mostrados são média ± desvio padrão. Os valores representam a concentração de cDNA de um gene específico dividido pela concentração do cDNA de actina.

4.1.5 Identificação *in silico* de motivos de ligação do fator de transcrição XlnR

Os sítios funcionais de ligação ao XlnR de *A. niger* identificados contêm uma região 5'-TTAGCC- 3' ou uma região 5' -GGCTAG- 3' (VAN PEIJ et al., 1998; DE VRIES et al., 2002). A procura por regiões promotoras (500pb antes do “start” códon putativo transcricional) de 1.516 genes com aumento do acúmulo de mRNA (Tabela Suplementar 3) revelou 461 genes com regiões promotoras contendo pelo menos um desses dois sítios de ligação e 63 genes contendo múltiplos sítios de ligação (Tabela Suplementar 4). Pelo menos 15 genes que codificam transportadores putativos, incluindo An01g00850, An06g00260, An12g09770 e An15g05440, foram testados na indução por xilose (Tabela Suplementar 4, Tabela 13). Os genes An06g00260, An12g0970, An01g00850 e An15g05440 foram induzidos por xilose e reprimidos por glicose, sugerindo que seus sítios de ligação putativos ao XlnR podem ser funcionais (Tabela 13 e seção “genes que codificam transportadores”). Sítios de ligação putativos ao XlnR foram também encontrados na região promotora

de três genes que codificam um fator de transcrição, An5g00480 (*stuA*), um fator de transcrição envolvido na diferenciação, An01g08050 (*uaY*) um regulador positivo da utilização da purina e An07g08880 (*cys-3*) um regulador positivo do metabolismo do enxofre. Foram observados sítios de ligação ao XlnR nas regiões promotoras de dois genes que codificam proteínas que participam nas vias catabólicas da pentose e do fosfato:: An01g03740 (D-xilose redutase) e An07g03160 (transaldolase). Uma busca por regiões promotoras em genes que codificam celulasas e hemicelulasas (Tabelas 8 e 9) revelou que 8 (de um total de 18 genes codificadores de celulasas) e 11 (de um total de 21 genes codificadores de hemicelulasas) promotores, respectivamente, continham pelo menos um sítio de ligação e que entre eles, 5 promotores continham múltiplos sítios de ligação ao XlnR.

4.1.6. Análise do secretoma de *A. niger* crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido

Uma análise preliminar de proteínas secretadas por *A. niger* durante o crescimento em BE foi realizada. Para separação das proteínas aplicou-se as amostras em um gel de uma dimensão de poliácridamida (Figura 16). Após a corrida, nove bandas foram recortadas do gel e as proteínas foram eluídas, digeridas com tripsina e identificadas por espectrometria de massa (MS-MS) (Tabela 14). Através desta técnica foi possível identificar 17 proteínas diferentes que foram agrupadas em quatro diferentes classes: (1) celulasas ($n = 5$), (2) xilanases e enzimas relatadas para hidrólise de xilana ($n = 7$), (3) mistura de enzimas hidrolíticas ($n = 2$) e (4) proteases ($n = 3$). Somente três genes codificadores dessas proteínas não foram modulados na análise de *microarray*, são eles: glucana 1,4- α -glucosidase (*glc1A*-An03g06550), tripeptidil peptidase (não nomeado – An14g02470) e α -amilase ácida (*atmA* – An11g03340). Todas outras proteínas tiveram seus genes modulados positivamente na análise de *microarray* (Tabela Suplementar 3).

Figura 16 - Eletroforese em gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) de proteínas secretadas para o meio extracelular em *A. niger* após crescimento em bagaço explodido por 24 horas. Visualização das bandas proteicas após coloração com comassie G-250. As setas indicam as bandas recortadas e enviadas para identificação. Os números correspondentes às proteínas secretadas estão identificados na Tabela 14.

Tabela 14 – Identificação de proteínas por espectrometria de massa de sobrenadantes de *A. niger* durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.

Amostra*	Nome da proteína	Gene “locus”	Número de acesso NCBI GEO	Massa Mol. Teórica (kDa.)	“Score”	Cobertura da sequência (%)	Nível EG (log ₂ Cy5/Cy3)
1	β-glucosidase	An18g03570	[GEO:215260053]	90	107	16	2.56 ± 0.03
1	Xilosidase (<i>xlnD</i>)	An01g09960	[GEO:145230215]	87	176	18	2.10 ± 0.05
2	Glucana 1,4-α-glucosidase (<i>glaA</i>)	An03g06550	[GEO:145235763]	68	264	40	SD
2	Proteína hipotética	An14g02470	[GEO:145249068]	65	63	15	SD
3	1,4-β-D-glucana celobiohidrolase B (<i>cbhB</i>)	An01g11660	[GEO:145235763]	56	264	40	6.59 ± 0.15
3	α-amilase ácida	An11g03340	[GEO:145243632]	55	63	13	SD
3	α-N-arabinofuranosidase B	An15g02300	[GEO:1168267]	52	256	23	7.94 ± 0.10
4	1,4-β-D-glucana celobiohidrolase A	An07g09330	[GEO:74698499]	48	158	12	3.89 ± 0.20
4	candidato celulose 1,4-β-celobiosidase II (<i>cbh2</i>)	An12g02220	[GEO:145246118]	48	89	18	4.37 ± 0.05
5	Aspergillopepsina A	An14g04710	[GEO:1709632]	41	126	23	5.83 ± 0.09
6	Precursor da endo-1,4-beta-xilanase A	An03g00940	[GEO:145234695]	35	219	67	3.64 ± 0.06
6	1,4-beta-D-arabinoxilana arabinofuranohidrolase (<i>axhA</i>)	An03g00960	[GEO:145234699]	35	127	37	4.03 ± 0.01
6	Endo-1,4-beta-xilanase C	An03g00940	[GEO:292495635]	35	230	57	3.64 ± 0.06
6	Protease B	An14g04710	[GEO:1585070]	34	136	38	5.83 ± 0.09
7	Cadeia A, estrutura cristal da esterase ácido ferulico	An09g00120	[GEO:48425840]	28	105	40	6.17 ± 0.99
8	Endoglucanase A	An14g02760	[GEO:289595328]	25	99	22	4.36 ± 0.30
9	Xilanase	An01g00780	[GEO:13242071]	11	99	78	8.29 ± 0.04

NCBI GEO: “National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus”; **Kda:** kilodaltons; **EG:** expressão gênica; **Relação log₂ Cy5/Cy3:** Relação logarítmica na base 2 de cianina 5 e cianina 3; **SD:** sem dados. Dados apresentados na coluna da direita são médias ± desvio padrão. Coluna “Score” refere a algoritmo Mowse.

4.1.7 Discussão

Os resíduos de biomassa da cana-de-açúcar são produzidos em grandes quantidades em muitos países. No Brasil a produção é notável porque 100% da produção do bioetanol como biocombustível é derivado da cana-de-açúcar através da fermentação da sacarose pela levedura *S. cerevisiae*. O processo utiliza a sacarose acumulada no xilema da cana-de-açúcar e é convencionalmente chamado de “bioetanol de primeira geração”. Esse etanol corresponde a um terço da energia que pode ser extraída da cana-de-açúcar. Os outros dois terços, derivados das folhas e do bagaço são resistentes a fermentação direta pela *S. cerevisiae* porque este organismo não é capaz de produzir enzimas hidrolíticas para degradar a celulose e a hemicelulose. Em contraste, fungos filamentosos apresentam a habilidade de produzir grandes quantidades de enzimas hidrolíticas. Neste sentido, coquetéis enzimáticos baseados nessas enzimas têm sido propostos como um método alternativo para destruir a resistência desses resíduos à fermentação. A análise detalhada sobre a estrutura e a composição do bagaço da cana-de-açúcar ainda não foi publicado. Entretanto, é muito provável que a composição e estrutura da celulose, como por exemplo, a estrutura cristalina, o número e extensão das fibras, e da hemicelulose, como por exemplo, a ramificação e diferentes concentrações de pentose, no bagaço da cana-de-açúcar sejam diferentes de outras fontes de biomassa, como a palha de trigo. Desta forma, ainda existe a necessidade de entender-se a composição e estrutura e as enzimas necessárias para a completa hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar.

Um dos objetivos do presente estudo foi identificar a resposta transcricional da cepa selvagem N402 de *A. niger* quando crescida em bagaço-de-cana pré-tratado por explosão a vapor (bagaço explodido, BE). A anotação do genoma dessa cepa foi utilizada para a construção das lâminas do *microarray*. Entretanto, essa cepa é relatada como mais próxima do DNA gênomico da cepa de *A. niger* 3528.7 (ATCC 1015; american Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). [GenBank:X52521], a qual o genoma foi recentemente publicado (ANDERSEN et al., 2011). A sequência do genoma da cepa ATCC1015 não estava disponível quando este projeto começou, não possibilitando o uso dos genes anotados para o desenho das lâminas do *microarray*. A análise do *microarray* revelou cerca de 3.700 genes diferencialmente expressos em *A. niger* quando este foi crescido em BE. A anotação

funcional através da base de dados FunCat foi utilizada para determinar se grupos funcionais de genes distintos foram super-representados dentro do conjunto de dados. Essa análise revelou “metabolismo de compostos C e carboidratos” como a classe enriquecida mais significativa (Tabela Suplementar 2). Mais de 50% dos genes preditos no genoma de *A. niger* relacionados às celulases e xilanases foram “up-regulados” no crescimento em BE e muitos deles foram independentemente confirmados por RT-PCR em tempo real e espectrometria de massa. Existe um interesse considerável na investigação de genes regulados ao nível transcricional durante a degradação celulósica da biomassa por *A. niger* ou *T. reesei*. (FOREMAN, et al., 2003; ANDERSEN et al., 2008). Entretanto, em todas as publicações prévias, os indutores foram fontes de carbono simples e não substratos complexos como o bagaço de cana-de-açúcar. Uma exceção é um artigo que reporta o perfil transcricional de *Neurospora crassa* quando este foi crescido em *Miscanthus giganteus* como fonte de carbono (TIAN et al., 2009). Comparando-se os dados deste trabalho com os dados derivados do *N. crassa* crescido em *M. giganteus*, pode-se observar que o padrão de expressão de celulases e hemicelulases é similar considerando-se que as hidrolases específicas para grupos de ramificação da xilana apresentam sobreposição em sistemas comparados. Essa diferença pode ser atribuída ao número de hidrolases, as quais variam amplamente em fungos filamentosos. O genoma do fungo *N. crassa* é predito para ser mais limitado para a degradação de biomassa de planta, com mais de 100 genes codificando hidrolases, sendo que mais de 170 puderam ser identificados em *A. niger* (PEL et al., 2007; MARTINEZ et al., 2008), sugerindo que o último fungo talvez utilize uma ampla variedade de estrutura de polissacarídeos como fonte de carbono. Além disso, uma grande variedade de famílias de glicosil hidrolases (GH) e um número de membros está presente em cada família GH entre fungos com sequências de genoma disponíveis (VAN DEN BRINK, DE VRIES, 2011; COUTINHO et al., 2009). Entre os membros da família GH3, cinco membros no genoma de *N. crassa* e pelo menos dezessete no genoma de *A. niger* têm sido identificados (PEL et al., 2007). Somente um membro da família GH3 tem sido identificado no transcriptoma de *N. crassa* (NCU00810), entretanto na análise do *microarray* de *A. niger* revelou-se que oito membros da família GH3 foram “up-regulados” quando este fungo foi crescido em bagaço de cana explodido (An15g04800, An07g07630, An17g00520, An18g03570, An11g00200 e An17g00300 (xilosidases). Além disso, a expressão diferencial de

hidrolases específicas para a degradação de ramificações de xilana encontradas em *A. niger* poderia ser devido às diferenças nas estruturas da parede celular de cana-de-açúcar e *Miscanthus*. Entretanto, quando comparou-se 149 genes de *N. crassa* que mostraram enriquecimento em *M. giganteus* (para análise FunCat de genes que mostraram enriquecimento principalmente para o metabolismo de compostos C e carboidratos, ver conjunto de dados 1 nos dados suplementares publicado por Tian et al., 2009) com todos os dados de *A. niger* crescido em bagaço explodido (Tabela Suplementar 3) pode-se observar que 59% dos genes de *N. crassa* apresentam homólogos correspondentes que tiveram seu acúmulo de mRNA modulado também em *A. niger* (Tabela Suplementar 5). Por exemplo, genes que codificam transportadores putativos que poderiam estar envolvidos em transporte de carboidratos, como An15g03940, An14g01600 e An12g07450 (em *N. crassa* NCU04963, NCU5853 e NCU10021, respectivamente) também apresentaram acúmulo de mRNA na presença tanto de BE quanto de *Miscanthus* (Tabela Suplementar 5). Genes envolvidos no metabolismo de pentoses, como An1g10920 e An12g00030 (L-arabinitol 4-desidrogenase (*N. crassa* NCU00643) e xilitol desidrogenase (*N. crassa* NCU00891), respectivamente, também apresentaram acúmulo de mRNA em ambos substratos (Tabela Suplementar 5). Estes dados sugerem que embora biomassas diversas possam apresentar um impacto específico sob a expressão gênica, algumas características gerais nesses diferentes substratos afetam o acúmulo de mRNA em diferentes fungos filamentosos. Foram identificados também muitos genes que tiveram aumento no seu nível de expressão durante o crescimento em bagaço explodido e os quais codificam proteínas de função desconhecidas que são conservadas em outros fungos celulolíticos. A análise de deleção destes genes poderia proporcionar informações sobre suas funções.

A xilose, o principal componente da estrutura da xilana e outras pentoses derivadas das cadeias laterais da xilana, como arabinose, são assimiladas pela via da pentose fosfato. Como proposto por Witteveen et al. (1989), o catabolismo da pentose em *A. niger* inclui passos de redução e oxidação levando a formação de D-xilulose, a qual é convertida a D-xilulose-5-fosfato e entra na via da pentose fosfato. Identificou-se um aumento significativo do acúmulo de mRNA dos genes codificadores dessas enzimas (xilose redutase, An01g03740, xilitol desidrogenase, An08g09380 e D-xiluloquinase, An07g03140) durante o crescimento de *A. niger* em BE. Esses dados são apoiados pela análise dos promotores desses genes que

apresentaram domínios de ligação putativos ao XlnR (relatado aqui e por Foreman et al. (2003) e pela aumento de suas expressões quando *A. niger* foi crescido em xilose (FOREMAN et al., 2003). Além disso, na classificação da base de dados FunCat, a “via pentose fosfato” (PPP) foi mais representada em nossa análise sugerindo que esta via catabólica completa foi “up-regulada” quando *A. niger* foi crescido em BE. Hasper et al. (2000) mostrou que o XlnR também regula a D-xilose redutase (*xylA*), um gene da via catabólica da pentose, mas ainda permanece por ser determinado se a regulação ao nível de mRNA de outros genes da PPP também é mediada pelo XlnR.

Genes relacionados ao transporte de carboidratos também foram identificados na categoria “metabolismo de composto C e carboidrato”. A degradação de uma biomassa complexa resulta em produtos como glicose, celobiose, xilobiose e xilose. Esses produtos precisam ser transformados dentro do citoplasma do fungo para serem metabolizados. Por isso a “up-regulação” destes genes deve ser necessária para uma melhor utilização dos diferentes açúcares liberados da degradação do bagaço da cana-de-açúcar. A identificação de genes que codificam transportadores também foi realizada. Para este fim, sete genes que codificam transportadores foram selecionados e tiveram a sua expressão validada por RT-PCR em tempo real. Para checar a especificidade desses transportadores, foram testados genes com expressão induzida por xilose e reprimida por glicose. Todos esses genes foram induzidos em BE mostrando aumento no acúmulo de mRNA quando xilose foi utilizada como única fonte de carbono. *S. cerevisiae* não apresenta capacidade de utilização de xilose (JOJIMA et al., 2010; MADHAVAN et al, in press) e a construção por expressão heteróloga desses transportadores de *A. niger* em cepas capazes de transportar xilose e/ou outras pentoses mais eficientemente poderia melhorar a fermentação industrial de produtos hidrolizados da biomassa. Nenhum desses transportadores ou os seus homólogos em outros fungos filamentosos foram caracterizados.

As vias de sensoriamento e sinalização de nutrientes envolvendo hexoquinases, transportadores de glicose, receptores acoplados a proteína G e proteínas quinases têm sido caracterizadas em levedura (ZAMAN et al., 2008; GANCEDO, 2008; TURCOTTE, et al., 2010). Estudos de fungos filamentosos multicelulares encontram-se em estágio inicial. Entretanto, é claro que a situação é considerada mais complexa em fungos filamentosos do que em leveduras. Isso pode

ser devido à preferência de leveduras pela fermentação da glicose do que para o metabolismo aeróbico através do ciclo de Krebs como no caso dos fungos filamentosos. Embora hidrolases, transporte e assimilação de açúcar são essenciais para a degradação da biomassa, foi observada a indução de outras respostas celulares quando *A. niger* foi crescido em BE. Foi observado decréscimo do acúmulo de mRNA em vários genes envolvidos em crescimento celular e morfogênese. Devido ao fato de que *A. niger* cresce de modo conectado as fibras microscópicas do BE, não é possível avaliar com precisão o peso seco do micélio deste fungo. Foi realizada a medição da concentração de proteína total por ensaios de Bradford e Biureto, mas não foi possível a obtenção de resultados coerentes, provavelmente devido à interferência por açúcar. Entretanto, há a possibilidade de que houve um pequeno aumento da biomassa durante a exposição do micélio de *A. niger* por 24 horas em bagaço explodido. Este pequeno crescimento é refletido na redução do acúmulo de mRNA de diversos genes cruciais para a sinalização e a progressão do ciclo celular. Resta saber quão significativas são essas vias de transdução de sinal para a detecção de lignocelulose. Genes envolvidos em fermentação também demonstraram aumento no acúmulo de mRNA durante o crescimento de *A. niger* em BE. Há evidência na literatura indicando que alguma fermentação ocorra em adição à respiração através do ciclo de Krebs em fungos filamentosos (CHAMBERGO et al., 2002; MAEDA et al., 2004; XIE et al., 2004), e é possível que durante o crescimento em BE, *A. niger* metabolize açúcares através da via de fermentação juntamente com a via da pentose fosfato e o ciclo de Krebs.

O XlnR de *A. niger* é um fator de transcrição que funciona como o principal regulador, que ativa genes que codificam enzimas do sistema xilanolítico e celulolítico (STRICKER et al., 2006). Os ensaios de desvio da mobilidade eletroforética (EMSAs), DNase I footprinting, ensaios funcionais e comparação de vários promotores xilanolíticos tem ajudado a definir o consenso de ligação ao xlnR como 5'-GGCTAA-3' ou 5'-GGCTAG-3' (RUEPP et al., 2004; VAN PEIJ, et al., 1998). Foi realizada a identificação de um ou dois desses motivos em diversos sítios putativos de ligação ao XlnR nos promotores desses genes que foram induzidos por BE. Não foi possível identificá-los em um número de celulasas, hemicelulasas e genes que codificam transportadores de xilose, o que sugere a existência de outro motivo de ligação ao XlnR. Uma maior caracterização do acúmulo de mRNA desses genes no mutante $\Delta xlnR$ bem como ensaios de ligação ao promotor (EMSA)

poderiam ajudar a esclarecer se os motivos putativos são funcionais. O homólogo de XlnR de *A. oryzae* liga-se em 5'-GGCTAA-3' ou 5'-GGCTAG-3' (MARUI ET AL., 2002) enquanto que o homólogo Xyr1 de *T. reesei* liga-se a vários motivos 5'-GGC(AT)₃-3' (FURUKAWA et al., 2008). Portanto é possível que existam outros motivos de ligação ao XlnR funcionais diferentes daqueles, sendo que maiores investigações são necessárias para esclarecer essa questão.

Módulo 4.2: Caracterização funcional de proteínas quinases e fosfatases não essenciais na regulação da produção de enzimas hidrolíticas em *Aspergillus nidulans*.

***Artigo:** Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. Brown, N. A; Gouvêa, P. F.; Krohn, N. G.; Savoldi, M.; Goldman, G. H.

***Artigo aceito para publicação no periódico “Biotechnology for Biofuels”**

4.2.1 “Screening” da coleção de quinases não essenciais (NPKs) envolvidas na produção de celulasas

Inicialmente a coleção de 103 NPKs foi avaliada visualmente quanto à redução do crescimento na presença de avicel 1 % como fonte única de carbono. Onze mutantes demonstraram redução no crescimento na presença de avicel (dados não mostrados). Para a caracterização destes mutantes, um primeiro experimento para dosagem de proteína total foi realizado, onde estes onze mutantes demonstraram uma redução no conteúdo de proteína total, quando cultivados em meio mínimo líquido+avicel 1% como única fonte de carbono durante 10 dias. Entretanto, quando cultivados em meio completo durante 48 horas, estes 11 mutantes não mostraram uma redução significativa no peso seco ($p < 0.01$) (Figura 17 A e B). Quando comparados com a cepa selvagem, a redução no crescimento das cepas $\Delta pkaC$, $\Delta sakA$ e $\Delta yakA$ em meio completo foi menor do que a redução do crescimento em MM+avicel 1%. A maioria destes 11 mutantes não demonstraram redução no crescimento radial em meio sólido completo ou MM+avicel 1%, exceto para as cepas $\Delta mpkA$ e $\Delta pkaC$ que mostraram extrema diminuição do crescimento radial em ambos os meios sólidos (dados não mostrados).

Figura 17 - A redução no crescimento específico em avicel das onze NPKs. (A) Peso seco das onze NPKs em meio completo. 1×10^7 conídios de cada cepa foram inoculados em meio completo e incubados por 24 h. Os resultados são a média de três repetições e as barras de erros representam o desvio padrão. **(B)** Dosagem de proteína total das onze quinases em Meio Mínimo + 1% Avicel. 1×10^7 conídios de cada cepa foram inoculados em MM+avicel 1% (p/v) e incubados por 10 dias. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) com reagente comercial. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

A função destas 11 NPKs foi determinada através de homologia (BLASTp) com *S. cerevisiae* revelando NPKs envolvidas na detecção de nutrientes e energia celular e na regulação do crescimento celular e endocitose (Tabela 15). Várias das NPKs identificadas são conhecidas por estarem envolvidas na via de sinalização do AMPc (*pkaC*, *schA*, *ypkA*), no uso de uma fonte alternativa de carbono (*snfA*, *sakA*), nas respostas ao “starvation” (*atmA*, *pkpA*) e endocitose ou polarização (*fpkA*, *mpkA*, *prkA*).

Tabela 15 - Sítios conservados nas cascatas de sensoriamento e sinalização de nutriente, metabolismo de carboidratos e crescimento celular das onze NPKs que tiveram redução no crescimento em avicel 1%.

AspGD	Nome do gene em <i>A. nidulans</i>	Melhor “hit” em <i>S. cerevisiae</i>	Função
An0038	<i>AtmA</i>	<i>Tel1</i>	Metabolismo do fosfolípido, dano ao DNA, polaridade celular, “starvation”
An10485	Não caracterizado (<i>CbkA</i>)	<i>Cbk1</i>	Sinalização RAM, regulação da morfogênese celular
An0144	Não caracterizado (<i>FpkA</i>)	<i>Fpk1</i>	Regulação da endocitose, síntese de esfingolípido
An5666	<i>MpkA</i>	<i>Slf2</i>	MAP quinase, germinação, crescimento polarizado
An6305	<i>PkaC</i>	<i>Tpk2</i>	Promove crescimento em resposta à nutrição
An6207	Não caracterizado (<i>PkpA</i>)	<i>Pkp1</i>	Regulação negativa de piruvato desidrogenase
An10515	Não caracterizado (<i>PrkA</i>)	<i>Prk1</i>	Organização do filamento de actina, endocitose
An5728	Não caracterizado (<i>SakA</i>)	<i>Sak1</i>	Ativador “upstream” do complexo SNF1
An4238	<i>SchA</i>	<i>Sch9</i>	Sinalização AMPc, papel sobreposto com Ras/PKA, regulado pelo complexo TOR
An7695	Não caracterizado (<i>SnfA</i>)	<i>Snf1</i>	Necessário para a transcrição de genes reprimidos por glicose
An7104	Não caracterizado (<i>YakA</i>)	<i>Yak1</i>	Inibição do crescimento em resposta à glicose, negativamente regulado por Ras/PKA

Em seguida, foram determinadas a atividade de endocelulase destes 11 mutantes e a transcrição dos dois genes principais (endoglucanase *eglA/B*) através de RT-PCR em tempo real a fim de confirmar que estas NPKs estavam relacionadas na regulação de celulase e/ou na repressão catabólica de carbono (CCR). Tanto a atividade de endocelulase e a transcrição de *eglA/B* foram dramaticamente reduzidos em 10 dos 11 mutantes depois de 5 dias de crescimento em MM+avicel 1% (Figuras 18 A e B). Apenas o $\Delta mpkA$ mostrou-se semelhante ao tipo selvagem nos níveis de atividade de endocelulase e na transcrição de *eglA/B*. A cepa $\Delta mpkA$ foi então excluída para posterior análise. A dosagem da atividade endoxilanolítica também foi realizada nestes mutantes (Figura 18 C), onde sete das onze NPKs apresentaram a atividade de xilanase reduzida.

Figura 18 - A redução na transcrição e produção de enzimas hidrolíticas nos mutantes de NPKs. Os mutantes de NPKs e a cepa selvagem foram inoculadas em MM+frutose 1% por 24 horas e, em seguida, transferidos para MM+avicel 1%(p/v) ou MM+xilana 1% (p/v) como única fonte de carbono por 5 ou 3 horas, respectivamente. **(A)** Atividade enzimática de celulase em MM+avicel 1% (p/v) por 5 dias. **(B)** A atividade enzimática de xilanase em MM+xilana 1% (p/v) por 3 dias. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima requerida para degradar 1 μ M de açúcar reduzido de xilose equivalentes por um minuto a partir de arabinoxilana em pH 4,5 e 40°C. Os resultados são a média de três repetições e as barras de erros representam o desvio padrão. **(C)** A expressão relativa dos principais genes de endoglucanase, *eglA* e *eglB*, do micélio isolado das culturas utilizadas para determinar a atividade de celulase. Resultados de quatro grupos de experimentos foram combinados para cada determinação. Os dados mostrados são média $\pm$ desvio padrão. Os valores representam a concentração de cDNA de um gene específico dividido pela concentração do cDNA de *tubC*. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

A identificação de várias NPKs envolvidas na via de sinalização do AMPc necessárias para a produção de celulase e xilanase resultou no interesse de investigar-se a atividade da proteína quinase A (PKA) na cepa selvagem, na presença de diferentes fontes de carbono. Culturas crescidas “overnight” em MM+frutose 1% foram transferidas para fontes de carbono alternativas e a atividade de PKA foi determinada. Não foi possível observar diferença significativa na atividade de PKA entre diferentes fontes de carbono, com exceção em MM+avicel 1% ou MM sem fonte de carbono onde a atividade de PKA foi aproximadamente o dobro (Figura 19). Apenas um nível constante muito baixo da atividade de PKA foi observado no mutante $\Delta pkaC$ em todas as fontes de carbono. Na ausência de capacidade de síntese de AMPc, avaliada por meio de utilização do mutante adenilato ciclase, $\Delta cyaA$, a atividade de PKA foi detectada em todas as fontes de carbono, demonstrando a existência da ativação de uma via AMPc independente da ativação de PKA (Figura 19), que pode ocorrer sob condições da ausência de fonte de carbono. Em seguida, o envolvimento dos componentes “upstream” da via AMPc-PKA na produção de celulase foi investigada. A cepa com $RasA^{G17V}$ constitutivamente ativado foi utilizada e resultou em uma redução de aproximadamente oito vezes na atividade de endocelulase após 5 dias de crescimento em MM+avicel 1% (Selvagem 484 ± 48 U / ml; RAS^{G16V} 60 ± 6 U / ml). Isto confirma que a ativação da rota convencional de PKA inibe a produção de celulase, sugerindo que a redução da fonte de carbono induz a hiperatividade de PKA a qual executa função (ões) alternativa(s) que, direta ou indiretamente, contribuem para o crescimento em celulose.

Figura 19 - Dosagem da atividade de PKA em diferentes fontes de carbono. 1×10^7 conídios de cada cepa foram inoculados em MM+frutose 1% (p/v) e incubados por 24 h. Após as culturas foram transferidas para diferentes fontes de carbono e a atividade de PKA foi determinada através do kit PeptagcAMP (Promega), realizado de acordo com as instruções do fabricante. A intensidade do substrato fosforilado de cada cultura, e dos controles internos AMPc (positivo) e água (negativo) fora determinada por análise de densitometria utilizando o programa ImageJ. Os resultados são apresentados como a atividade de PKA total por cultura.

4.2.2 Avaliação das NPKs na “repressão catabólica do carbono” (CCR) através da sub-localização celular de CreA

Com o objetivo de controlar a dinâmica de CCR em *A. nidulans* a proteína Crea::GFP sob o controle do promotor nativo foi construída, permitindo o estudo da localização nuclear de CreA sob condições de repressão/ desrepressão e a avaliação dos componentes de sinalização que leva a compartimentalização celular de CreA. A cepa Crea::GFP construída apresentou crescimento igual ao do tipo selvagem em diferentes fontes de carbono repressoras e desrepressoras (dados não mostrados). A análise microscópica de fluorescência em diferentes fontes de carbono, que incluem diversos polissacarídios simples ou complexos, não-polissacarídios e na ausência de carbono, auxiliou no entendimento dos sinais envolvidos na localização nuclear e na repressão do CreA. A cepa Crea::GFP foi cultivada em meio contendo 1 % glicose por aproximadamente 16 horas, o que resultou em 100% de localização nuclear do CreA (Figura 20); após este período os tubos germinativos foram então transferidos para

meios contendo fontes de carbono alternativas. Quando o meio de transferência continha mono- ou dissacarídeos facilmente metabolizáveis, a localização nuclear de CreA foi elevada (Tabela 16). Estas fontes de energia são facilmente absorvidas e requerem menos passos enzimáticos antes de entrar na via da glicólise. Dentro deste conjunto, a glicose, que é fosforilada e entra diretamente na via da glicólise, representou 100% da localização nuclear de CreA::GFP. A celobiose, que requer a hidrólise intracelular em glicose e a xilose a qual entra na via da glicólise e é metabolizada pela via das pentoses fosfato (PPP), demonstrou 68% e 70%, respectivamente, de localização nuclear. O glicerol, uma fonte alternativa de polissacarídeos, resultou num nível muito mais baixo, 31%, de localização nuclear. Polissacarídeos complexos apresentaram a menor localização nuclear de CreA, e o nível parece refletir na solubilidade da fonte de carbono, com xilana solúvel (hemicelulose) demonstrando um nível mais elevado de localização nuclear do CreA do que a fonte de carbono não-solúvel avicel cristalino (celulose sintética). Sob condição de desrepressão, avicel 1%, nenhuma localização nuclear foi observada (Figura 20). O crescimento da cepa CreA::GFP por aproximadamente 16 horas em glicose (100% de localização nuclear) e, em seguida, a transferência para meio sem de fonte de carbono durante 5 h (0% de localização nuclear) permitiu o estudo dos sinais positivos para a repressão de CreA. A adição nas culturas sem fonte de carbono de 2-deoxi-glicose que não pode ser metabolizado, ou 6-deoxi-glicose que não pode ser fosforilado, demonstraram que o sinal positivo para a localização nuclear de CreA requer a fosforilação da glicose (Tabela 16). Os cruzamentos sexuais entre vários mutantes NPKs identificados a partir da triagem da coleção de quinases com a cepa CreA::GFP permitiu a confirmação de que *schA* e *snfA* são necessários para a desrepressão de CreA. A ausência de *schA* e *snfA* resultou em um aumento da presença de CreA no núcleo durante o crescimento em avicel 1% (Tabela 16). Da mesma forma, os cruzamentos sexuais entre estas três NPKs e a cepa $\Delta creA4$ (Shroof et al., 1997) restaurou a atividade das endocelulase das NPKs similarmente aos níveis do selvagem (dados não mostrados). No entanto, a ausência de *atmA* ou do fator de transcrição regulador de AtmA, o *xprG*, e da *pkaC* não afetou a localização nuclear e a desrepressão de CreA (Tabela 16). Coletivamente, estes conjuntos de dados sugerem que *schA* e *snfA* são necessários para a desrepressão de CreA permitindo assim a indução de genes de celulase no crescimento em avicel, enquanto *atmA* e *pkaC* realizam funções adicionais que contribuem para a produção da celulase.

Figura 20 - Localização nuclear de CreA::GFP em condições de repressão e desrepressão. A cepa CreA::GFP foi crescida em MM+glicose 1% (p/v) e MM+avicel 1% (p/v) por 16 horas a 25°C. Sob condições de repressão (glicose 1%) CreA::GFP localiza-se constantemente no núcleo enquanto que em condições de desrepressão (avicel 1%), CreA::GFP encontra-se fora do núcleo. Os canais DIC, GFP e DAPI (para coloração Hoechst) estão mostrados. Barra: 5µm.

Tabela 16 - Localização nuclear de CreA::GFP após transferência para meio contendo diferentes fontes de carbono.

Cepa	Cultura Inicial (número de hifas)	CreA Nuclear	Cultura transferência (número de hifas)	CreA Nuclear
Selvagem	Glicose 16h (82)	100 %	Xilose 2h (48)	68 %
			Celobiose 2h (74)	68 %
			Xilana 5h (114)	18 %
			Avicel 5h (74)	4 %
			Glicerol 2h (32)	31 %
			Sem carbono 5h (35)	0 %
Selvagem	Xilose 16h (24)	70 %	Glicose 1h (20)	100 %
Selvagem	Avicel 16h (22)	0 %	Glicose 1h (30)	100 %
Selvagem	Glicose 16h e após sem fonte de carbono 5h (50)	0 %	Glicose 1h (32)	100 %
			2-deoxi-glucose 1h (44)	100 %
			6-deoxi-glucose 1h (35)	0 %
$\Delta schA$	Glicose 16h (24)	100 %	Avicel 5h (31)	83 %
$\Delta snfA$	Glicose 16h (19)	100 %	Avicel 5h (28)	76 %
$\Delta atmA$	Glicose 16h (20)	100 %	Avicel 5h (22)	0 %
$\Delta xprG$	Glicose 16h (20)	100 %	Avicel 5h (20)	0 %

Localização nuclear fúngica de CreA::GFP é apresentada como a porcentagem do número total de hifas avaliadas.

4.2.3 Identificação de genes modulados nas cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$ crescidas em avicel 1% através de hibridações de *microarray*

Para obter-se uma visão sobre genes que codificam enzimas hidrolíticas e vias que são influenciadas durante o crescimento em avicel 1%, determinou-se o perfil transcricional das cepas $\Delta schA$, $\Delta snfA$ e selvagem através do experimento de hibridações de *microarray*. Em resposta à transferência para meios contendo avicel 1% por 8 horas, as cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$ modularam a transcrição de um número semelhante de genes, enquanto que após 24 horas, o selvagem apresentou uma resposta muito maior da transcrição, modulando aproximadamente o dobro de genes (Tabela 17). A análise FetGOat foi utilizada para identificar os termos GO mais representados dentro das listas de genes diferencialmente expressos para cada cepa. Após a cultura de 8 horas em avicel 1% não houve nenhum processo biológico, componente celular ou molecular mais representado na cepa selvagem. Após 24 horas de cultura em meio contendo avicel 1%, a cepa selvagem demonstrou uma maior representação na modulação de genes envolvidos na respiração aeróbica, carboidratos relacionados com os processos catabólico/metabólico e biogênese ribossomal (Tabela 18). A maior representação de múltiplos componentes ribossômicos foi específica para a cepa selvagem. Além dos processos mais representados na cepa selvagem, a cepa $\Delta schA$ também demonstrou grande representação dos processos metabólicos do álcool e quinona, assim como a produção de energia derivada de compostos orgânicos. Nenhum dos processos biológicos, componentes celulares ou de função molecular foram mais representados na cepa $\Delta snfA$ após 24 horas de crescimento em avicel 1%, demonstrando a perda completa de uma resposta coordenada. A análise por Diagrama de Venn da lista de genes diferencialmente regulados novamente demonstrou que o transcriptoma da cepa selvagem foi o mais distinto depois de 24 horas de cultura na presença de avicel 1% (Figura 21 A e B), enquanto que das duas cepas mutantes de NPKS, $\Delta snfA$ demonstrou a menor semelhança com a cepa selvagem.

Tabela 17 - Número total de genes diferencialmente expressos (t-test $p < 0.01$) após transferência de meio completo para MM+avicel 1% por 8 e 24 horas nas cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$.

Genes diferencialmente expressos	Selvagem		$\Delta schA$		$\Delta snfA$	
	8 horas	24 horas	8 horas	24 horas	8 horas	24 horas
Todos	712	2387	813	1692	693	1350
“Up regulated”	405	1111	372	867	356	867
“Down regulated”	307	1276	441	825	337	710

Tabela 18 - Os termos GO mais representados na análise FetGOat ($p < 0.05$) dos genes diferencialmente expressos nas cepas selvagem e $\Delta schA$ após transferência de meio completo para meio mínimo+avicel 1% por 24 horas.

Selvagem		$\Delta schA$	
Catabolismo/Metabolismo de Carboidrato		Catabolismo/Metabolismo de Carboidrato	
GO:0016052	Catabolismo carboidrato	GO:0044262	Metabolismo carboidrato
GO:0030243	Metabolismo celulose	GO:0005996	Metabolismo monossacarídios
GO:0044275	Catabolismo carboidrato	GO:0005975	Metabolismo carboidrato
GO:0006090	Metabolismo piruvato	GO:0046364	Biossíntese mono ssacarídios
		GO:0016052	Catabolismo carboidrato
Biogênese de Ribossomo e Processamento de RNA		Respiração e produção de energia	
GO:0022613	Biogênese de ribonucleoproteínas	GO:0046165	Biossíntese de álcool
GO:0000462	Maturação de SSU-rRNA	GO:0006066	Metabolismo de álcool
GO:0000478	Processamento de rRNA	GO:0045333	Respiração celular
GO:0030490	Maturação de SSU-rRNA	GO:0009060	Respiração aeróbica
GO:0042254	Biogênese de ribossomo	GO:0015980	Energia derivada pela oxidação de compostos orgânicos
GO:0016072	Metabolismo de rRNA	GO:0006091	Geração de precursors de metabolites e energia
GO:0006364	Processamento de rRNA		
GO:0000479	Processamento de rRNA	Biosíntese de Quinona	
GO:0034470	Processamento de rRNA	GO:0042375	Metabolismo do cofator da quinona
GO:0042274	Biogênese da subunidade ribossomal	GO:0006744	Biosíntese de ubiquinona
GO:0034660	Metabolismo de ncRNA	GO:0006743	Metabolismo de ubiquinona
		GO:0045426	Biosíntese do cofactor de quinona
Respiração		Biosíntese de cofatores	
GO:0009060	Respiração aeróbica	GO:0051188	Biosíntese de cofator
GO:0007005	Organização mitocondrial	GO:0051186	Metabolismo de cofator
Biosíntese de cofatores			
GO:0051188	Biosíntese de cofator		
GO:0051186	Metabolismo de cofator		

Nota: Termos não muito representados foram identificados na cepa $\Delta snfA$. Para a listagem total ver tabela suplementar 1.

Figura 21 - Identificação de genes modulados pelos mutantes $\Delta schA$, $\Delta snfA$ e pela cepa selvagem em MM+avicel 1%. O diagrama de Venn para os genes diferencialmente regulados ($p < 0.01$) nas cepas selvagem (WT), $\Delta schA$ e $\Delta snfA$. **(A)** Crescimento por 8 horas em avicel 1%. **(B)** Crescimento por 24 horas em avicel 1%.

A lista de genes correspondendo aos diferentes segmentos do diagrama de Venn foi subdividida em genes que demonstraram um aumento ou uma diminuição na transcrição após a transferência para meio contendo avicel 1%. O perfil funcional dos genes que foram induzidos pelo crescimento de 24 horas na presença de avicel 1% foi determinado utilizando-se o FunCats MIPS e a bases de dados de enzimas CAZy (Tabela Suplementar 2). O resultado demonstrou que a indução dos genes em resposta ao crescimento em avicel 1% foi altamente dependente de *snfA* e menos dependente de *schA*, o qual mostrou uma sobreposição com *snfA* (Figura 22).

Figura 22 - A contribuição de *snfA* e *schA* na indução de genes em avicel 1%. A distribuição de diferentes categorias funcionais e enzimas CAZy, incluindo múltiplas glicosil hidrolases (GH) entre os genes que demonstraram elevada transcrição na cepa selvagem após o crescimento por 24 horas em avicel e se essa indução foi dependente da ação de *schA* e/ou *snfA*. **Nota:** indução pouco dependente das respostas de *schA* ou *snfA* (azul), a contribuição substancial de *snfA* representada pela soma de genes dependentes de *snfA* (roxo) e genes dependentes de *snfA* mais *schA* (vermelho), enquanto que a maioria das respostas dependentes de *schA* sobrespuseram-se com *snfA* e o número limitado de respostas especificamente dependentes de *schA* (verde). **GH:** Glicosídeo hidrolases.

As enzimas CAZy dentro destes conjuntos de dados foram identificadas para criar um perfil da capacidade hidrolítica de cada cepa. No total, 54 glicosídeo hidrolases (GHs) foram induzidas por avicel 1% na cepa selvagem, dentre as quais, oito foram induzidas somente na cepa selvagem, oito foram induzidas nas três cepas, quatorze foram induzidas tanto na cepa selvagem quanto na cepa $\Delta schA$ e somente uma foi induzida tanto na cepa selvagem quanto na cepa $\Delta snfA$ (Figura 23). Muitas hemicelulases também foram induzidas por crescimento em avicel 1% por 24 horas, apesar da ausência de um indutor específico no meio. Em seguida, a avaliação da modulação da expressão de fatores de transcrição que são conhecidos por estarem envolvidos com a produção de enzima hidrolítica foi realizada (Tabela suplementar 2). A expressão do *creA* e *araR* não mostrou regulação diferencial em todos os tempos, nas três cepas. No entanto, *xlnR* foi mais expresso na cepa selvagem e $\Delta snfA$ após 24 horas de crescimento, na presença de avicel 1%, mas não na cepa $\Delta schA$. A indução do fator de transcrição *clrB* foi muito maior do que do fator de transcrição *clrA* na cepa selvagem, entretanto esta indução estava ausente nas cepas $\Delta schA$ e $\Delta snfA$. Fatores de transcrição adicionais modulados apenas na cepa selvagem incluem um homólogo Gcn4p (AN3675) o qual está envolvido na homeostase do glicogênio, autofagia e ao estresse causado pela ausência de carbono, nos reguladores positivos do “regulon” do etanol (*alcR*) e na utilização do acetato (*facB*). Em ambas cepas, selvagem e $\Delta schA$, a resposta transcricional de fatores de transcrição relacionados à ausência de aminoácidos (AN1812) e na utilização de ácidos graxos, *farA*, foi induzida. O homólogo de Gal4, XlnR, (AN7610) que é regulado por CreA e está envolvido na indução de enzimas que degradam xilana, foi induzido na cepa selvagem e na cepa $\Delta snfA$.

A modulação de genes envolvidos em transporte também foi avaliada. Diferentes grupos de transportadores foram igualmente induzidos após 24 horas de crescimento em avicel 1% em todas as cepas (14 transportadores), nas cepas selvagem e $\Delta schA$ (33 transportadores), nas cepas selvagem e $\Delta snfA$ (6 transportadores) e especificamente na cepa selvagem (41 transportadores). A maioria destes transportadores não tem uma função definida em *A. nidulans*. Entretanto os genes definidos funcionalmente incluem transportadores de aminoácidos, açúcares, metal, cálcio e sódio (Tabela Suplementar 2). Os transportadores putativos de açúcar (AN6669) e o transportador α -glicose (AN3204) foram altamente expressos somente na cepa selvagem, enquanto que transportadores de açúcar (AN8737) e um transportador de alta afinidade de hexose (AN6923) foram induzidos tanto na cepa selvagem quanto na cepa $\Delta schA$.

Em todas as cepas, após 24 horas de crescimento em avicel 1%, houve a indução do fator de transcrição *xprG*, relacionado a resposta a falta de nutrientes e do *hacA*, o qual regula a resposta ao enovelamento da proteína (“unfolded protein response”), sugerindo a existência do estresse induzido pela falta de nutrientes. Vários genes relacionados à resposta a falta de nutrientes foram relatados, *atg8*, *hxcK* e a GPCR *gprH* também foram regulados. Entretanto, apesar da indução de *xprG* em todas as cepas, esses três genes de resposta a falta de nutrientes não foram induzidos na cepa $\Delta snfA$, enquanto que a quinase que ativa *xprG* (Krohn, N.C.; dados não publicados), *atmA*, foi reprimida em baixos níveis. Outras quinases sensoras do estado de energia, incluindo os homólogos *sakA* e *gal83*, os quais são necessários para a ativação de Snf1 e sua localização nuclear em *S. cerevisiae*, foram induzidos somente na cepa selvagem, enquanto a quinase TOR (AN5982) não foi induzida somente na cepa $\Delta schA$.

Figura 23 - A redução da transcrição de enzimas celulolíticas e xilanolíticas em *schA* e *snfA*. log2 número de vezes na expressão de algumas enzimas hidrolíticas nas cepas selvagem, $\Delta schA$ e $\Delta snfA$ após transferência de meio completo para MM+avicel 1% por 24 horas.

Juntos, os dados do transcriptoma demonstram que *schA* e *snfA* são necessárias para regular a resposta a limitação de carbono e ao crescimento em avicel. Essas duas NPKs exercem uma função parcialmente sobreposta na modulação de enzimas CAZy, transportadores de açúcar e aminoácidos, fatores de transcrição e metabolismo, onde *snfA* parece ter primordial importância.

4.2.4 “Screening” da coleção de fosfatases não essenciais (“non-essential phosphatases – NPPs”) envolvidas na produção de celulasas

Como um primeiro passo, os mutantes da coleção de fosfatases, a qual contém 28 NPPs, foram crescidos em MM+avicel 1% como única fonte de carbono. Nove NPPs não foram capazes de crescer em meio mínimo contendo glicose 2% e avicel 1% (AN0129, AN0914, AN3810, AN4419, AN4544, AN4896, AN5722, AN10077 e AN10138). Desta forma, não foi possível estudar o papel dessas NPPs em relação ao crescimento em avicel e produção de celulasas. As sete NPPs que foram capazes de crescer em MM+glicose 2% e mostraram crescimento reduzido em MM +avicel 1%, em termos de proteína total, não demonstraram diferenças significantes no crescimento em MM+2% glicose (Figura 24 A e B). A redução do crescimento em avicel 1% foi correlacionada com a redução da atividade de celulasas e com a diminuição na expressão de *eglA/B* (Figura 24 C e D). A dosagem da atividade endoxilanolítica também foi realizada e após o crescimento por três dias em xilana 1%, também foi observada uma redução na produção de xilanasas (Figura 24 E). A função de sete NPPs foi identificada e a sua função putativa foi determinada através da homologia com *S. cerevisiae* (Tabela 19). Muitas NPPs identificadas apresentam um papel no ciclo celular (*ltpA*, *cdcA*, *sitA*) e na regulação de MAPK (*ptcA*, *ptpA*). Ppg1A, que é necessária para o acúmulo de glicogênio, também associa-se com Tap42 e Sit4 em *S. cerevisiae* e está envolvida na sinalização TOR.

Figura 24 - As sete NPPs necessárias para o crescimento em avicel 1%. (A) O peso seco das NPPs quando foram crescidas em MM+glicose 2% (p/v) por 48 horas. (B) Quantidade de proteína total das NPPs crescidas em MM+avicel 1% (p/v) por 10 dias. (C) A atividade de celulase em MM+avice 1% (p/v) por 5 dias. (D) A expressão relativa dos dois genes principais de endoglucanases, *eglA* e *eglB*, no micélio isolado das culturas utilizadas para dosagem de celulase. Os valores representam a concentração de cDNA de um gene específico dividido pela concentração do cDNA de *tubC*. (E) A atividade de xilanase em MM+ xilana 1% (p/v) por 3 dias. Os resultados são a média de três repetições e as barras de erros representam o desvio padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Tabela 19 - Descrição funcional de sete fosfatases que apresentaram redução de crescimento radial em MM+avicel 1% e redução da transcrição de *eglA/B*.

AspGD	Nome do gene em <i>A. nidulans</i>	Melhor “hit” em levedura	Função
An10570	Não caracterizado (<i>LtpA</i>)	<i>Ltp1</i>	Ciclo celular
An3793	<i>PpzA</i>	<i>Ppz1</i>	Resistência ao estresse oxidativo
An5057	Não caracterizado (<i>cdcA</i>)	<i>Cdc14</i>	Ciclo celular, saída da mitose, progressão da meiose
An6892	Não caracterizado (<i>PtcA</i>)	<i>Ptc1</i>	Proteína fosfatase Tipo 2C, inativação do estresse osmótico e ativação da via MAPK na resposta ao ferormônio
An6982	<i>PtpA</i>	<i>Ptp3</i>	Inativação da via MAPK por estresse osmótico
An0164	Não caracterizado (<i>Ppg1A</i>)	<i>Ppg1</i>	Fosfatase Tipo 2A, necessária para acúmulo de glicogênio, associado com Tap42
An0504	<i>SitA</i>	<i>Sit4</i>	Transição G1/S do ciclo mitótico, modulação de funções mediadas por Pkc1p incluindo parede celular e organização da actina do citoesqueleto

4.2.5 Discussão

Uma profunda compreensão dos mecanismos pelos quais os fungos filamentosos percebem a nutrição e o estado energético intracelular, e assim, por sua vez, regulam a secreção de enzimas hidrolíticas é de suma importância para o desenvolvimento da produção de etanol lignocelulósico industrial eficiente. Proteínas quinases e fosfatases agem como sensores intracelulares e desempenham papéis centrais em numerosas cascatas de sinalização que coordenam o crescimento de hifas e metabolismo em resposta a disponibilidade de nutrientes. Foram identificadas proteínas quinases e fosfatases necessárias para o crescimento em celulose como única fonte de carbono, revelando como diferentes subconjuntos foram necessários para a produção de celulase e hemicelulase. A modulação da desrepressão de CreA foi posteriormente identificado como sendo o mecanismo das duas NPKS centrais, SchA e SnfA, controlando a produção de enzimas hidrolíticas. A transcrição de enzimas lignocelulósicas é rigorosamente controlada pela ação competitiva do repressor CreA e polissacarídeos indutores específicos. Este estudo demonstrou que a ausência de carbono resultou na ausência de CreA do núcleo e desrepressão, similar ao mecanismo de Mig1 observado em *S. cerevisiae* (CARLSON, 1999). Uma investigação anterior da localização celular de CreA utilizou uma proteína de fusão sob o controle de um promotor constitutivo e demonstrou uma localização subcelular constitutiva independente da fonte de carbono (ROY et al., 2007). Tal abordagem poderia sobrecarregar o sistema e pode ter contribuído para as diferenças observadas entre os dois projetos experimentais. Novamente, similar a *S. cerevisiae*, a ausência do homólogo *SNF1* de *A. nidulans*, *snfA*, o qual em *S. cerevisiae* está envolvido na exportação nuclear de Mig1 (CARLSON, 1999), resultou na habilidade reduzida de desrepressão do CreA em *A. nidulans*. A similaridade entre a desrepressão do CreA durante o crescimento em celulose e a ausência de carbono sugeriram que *A. nidulans* estava sob condições de baixa concentração de carbono em ambos os casos. A indução de celulasas e hemicelulasas quando o fungo foi crescido em celulose como única fonte de carbono, que não possui um indutor de celulase, também tinha sido previamente relatado sob condições de baixa concentração de carbono (CORADETTI et al., 2012) e podem ser unicamente a consequência da desrepressão de CreA ao invés da indução de um polissacarídeo específico. Isso é suplementado pela observação

da localização celular a qual é alta quando em presença de celobiose, um indutor conhecido de celulasas (ZNAMEROSKI et al., 2012). Esse conceito sugere que um período transiente de baixa concentração de nutriente é necessário a partir da desrepressão do CreA, liberando assim, o sítio de ligação do indutor para a indução de genes.

Em *S. cerevisiae*, o sensoriamento de glicose externa através da via GPCRs-PKA e a fosforilação intracelular da glicose, os quais resultam na ativação de RAS, promove CCR mediada por Mig1 (CARLSON, 1999). Entretanto em *A. nidulans*, a presença de glicose extracelular provou não ser essencial, enquanto a fosforilação da glicose foi essencial para a repressão de CreA. Como foi observado, após a adição de 2 e 6-deoxi-glicose não-metabolizável e não fosforilável, respectivamente, às culturas de CreA desreprimidas por ausência de carbono, levou a localização nuclear de CreA. A redução da capacidade celulolítica da cepa ativa RasA^{G17V} quando crescida em celulose fortalece a ideia de que a fosforilação da glicose e a sinalização por RAS induz a repressão de CreA. Interessantemente, *pkaC* foi identificado como sendo necessário para o crescimento da cepa selvagem em celulose e a atividade de PKA foi hiperativada durante o crescimento em celulose e na ausência de carbono, sugerindo que PKA executa papéis adicionais de indução na ausência de carbono em *A. nidulans* que talvez direta, ou indiretamente, influenciam o crescimento e a sobrevivência em celulose. Durante a ausência de carbono, níveis de AMPc e a atividade de PKA aumentam em células de mamíferos, promovendo o alongamento mitocondrial, prevenindo a degradação autofágica e mantendo a produção de ATP, enquanto o bloqueio do alongamento mitocondrial resulta em morte induzida por ausência de carbono (GOMES et al., 2011). Assim, em *A. nidulans* PKA talvez realize funções adicionais durante a ausência de carbono e crescimento em celulose, além da típica via GPCR/Ras-PKA.

Muitas NPKs adicionais envolvidas em resposta à ausência de carbono em muitos organismos, como *atmA* e *pkpA*, também foram identificados como sendo necessárias para o crescimento em celulose e a produção de enzimas celulolíticas. Em células de mamíferos, o complexo piruvato desidrogenase (“pyruvate dehydrogenase complex – PDC”) gera NADPH e acetil-CoA a partir da descarboxilação oxidativa do piruvato. O fluxo através do PDC é controlado por um ciclo de fosforilação/defosforilação catalisado pela quinase piruvato desidrogenase (PDK) e pela fosfatase piruvato desidrogenase (PDP). O estado de fosforilação do

PDC regula o consumo de glicose na respiração e regula também a preservação de glicose para gluconeogênese (WU et al., 2001). Sob condições de ausência de carbono, a quinase piruvato desidrogenase fosforila e inativa o PDC para conservar a glicose e promover a utilização de ácidos graxos (WU et al., 2001). Sendo assim, a identificação da quinase *pkpA* sugere que o período de privação de glicose é realizado por *A. nidulans* quando este cresce em celulose, o que é corroborado pelo aumento da regulação do uso de fontes alternativas de carbono, como aminoácido, etanol, acetato e ácido graxo.

A quinase ATM em mamíferos tem sido identificada no envolvimento da “starvation”, sinalização por insulina e na regulação da homeostase de glicose através da ação da fosforilação de p53, o qual regula o metabolismo de transcrição, respiração mitocondrial e transportadores de glicose. Além disso, uma via p53 independente de ATM tem sido demonstrada para ativar AMPK (o homólogo de *SnfA* em mamíferos) via LKB1 (o homólogo de mamífero de *SakA*) de rotas dependente e independente (ARMATA et al., 2010; DITCH; PAULL, 2012; SHACKELFORD; SHAW, 2009). Baixas taxas glicolíticas e estresse de energia em *A. nidulans* quando este é crescido em celulose poderia resultar em uma cascata de ativação *AtmA*, *SakA* e *SnfA*, regulando assim a função mitocondrial, captação de açúcar, utilização de ácido graxo e produção de enzima hidrolítica.

Demonstrou-se também como *SnfA* promove um papel chave na desrepressão de *CreA* e na modulação da transcrição, metabolismo e secreção de enzimas hidrolíticas. Homólogos de *snfA* em mamíferos e *S. cerevisiae* têm sido mostrado na interação com a quinase essencial TOR, a qual integra a entrada de nutrientes e fatores de crescimento que controlam o ciclo celular (WULLSCHLEGER, 2006). Interessantemente duas das fosfatases são necessárias para a produção de enzimas hidrolíticas e crescimento em celulose através da quinase TOR. Homólogos da quinase *schA* tem sido mostrados como atuando abaixo da cascata de sinalização por TOR (URBAN et al., 2007). Assim, na regulação da resposta transcricional e no crescimento em celulose, a sobreposição, rende um papel menor para *SchA*, quando comparada com *SnfA*. Além do mais, a similar incapacidade de desrepressão de *CreA* no crescimento em celulose, sugere que *SchA* também pode atuar abaixo de *SnfA* na via de sinalização em *A. nidulans*. Enquanto que em *S. cerevisiae* e *A. nidulans* a quinase *SchA* também tem demonstrado ter funções sinérgicas e opostas (FILLINGER et al., 2002; ROOSEN et al., 2005).

Muitas NPKs e NPPs envolvidas no crescimento filamentoso, polarização e morfogênese foram identificadas como sendo necessárias para o crescimento em celulose e secreção de hidrolases. Endo e exocitose são processos chaves para o sensoriamiento e interação com o meio ambiente. Tais processos tem sido demonstrados na regulação do transporte de glicose em células de mamíferos (FOLEY, et al., 2011). Portanto, a identificação de NPKs e NPPs poderia representar o impacto nessas mutações em endo e exocitoses, influenciando assim a secreção, a distribuição de transportadores na membrana celular e a importação de moléculas indutoras.

5. Conclusões

A proposta inicial deste trabalho foi verificar a regulação e produção de celulasas e hemicelulasas em *A. niger* e *A. nidulans*.

Os dados obtidos através dos experimentos realizados com *A. niger* indicam que:

- o fungo *A. niger* apresentou um crescimento íntimo nos fragmentos de bagaço explodido.
- a atividade de xilanase e celulase apresentou diferentes intensidades dependendo do tipo de açúcar no qual o fungo foi crescido.
- foi possível obter-se uma visão sobre genes que codificam enzimas hidrolíticas e vias que são influenciadas durante o crescimento de *A. niger* em BE, através do experimento de *microarray*, onde foi possível avaliar-se o perfil transcricional deste fungo.
- observou-se 3700 genes modulados em pelo menos um ponto experimental.
- existe uma redução na progressão de crescimento durante a incubação de *A. niger* em BE por 24 horas.
- genes que codificam celulasas e hemicelulasas apresentam aumento da expressão durante o crescimento em bagaço de cana-de-açúcar explodido.
- houve aumento no acúmulo de mRNA de vários genes envolvidos em fermentação, como álcool desidrogenase (*AlcB*; An01g12170) e lactato desidrogenase (*Ldh*; An11g09520), aumentando a possibilidade de que a fermentação lática e alcoólica ocorram concomitantemente com a sacarificação da biomassa.
- houve uma intensa modulação de vários genes envolvidos no metabolismo de compostos C e carboidratos e também na via da pentose fosfato, o que reflete a ampla metabolização e transporte de diferentes classes de açúcares durante a utilização da biomassa.

- observou-se uma intensa modulação do acúmulo de mRNA de genes que codificam potencias transportadores de açúcar.
- sete destes genes que codificam potencias transportadores de açúcar apresentaram aumento do acúmulo de mRNA quando o fungo foi crescido em BE.
- a identificação de genes que codificam transportadores de açúcar em *A. niger*, os quais foram baseados no seus perfis de expressão, podem ser promissores candidatos a transportadores de xilose.
- muitos genes encontrados no *microarray* apresentam motivos de ligação ao XlnR.
- foi possível identificar 17 proteínas diferentes que foram agrupadas em quatro diferentes classes: (1) celulasas ($n = 5$), (2) xilanases e enzimas relatadas para hidrólise de xilana ($n = 7$), (3) mistura de enzimas hidrolíticas ($n = 2$) e (4) proteases ($n = 3$) quando *A. niger* foi crescido em BE por 24 horas.

Os dados obtidos através dos experimentos realizados com *A. nidulans* indicam que:

- foi possível identificar-se 11 quinases e 7 fosfatases não essenciais, NPKs e NPPs, respectivamente, envolvidas na produção de celulasas e em alguns casos, na produção também de hemicelulasas.
- observou-se que um período inicial de “starvation” apresenta um papel na ativação das vias das quinases no sensoriamento de nutrientes e energia.
- a desrepressão de CreA é um pré-requisito essencial para a indução de enzimas hidrolíticas.
- foi possível observar-se que SnfA atua na desrepressão de CreA e na modulação de respostas transcricionais, regulando o metabolismo, transporte e secreção de enzimas hidrolíticas sendo primordial para o crescimento em celulose.

- a quinase SchA parece atuar com um mecanismo de sobreposição e função com SnfA.

Desta forma, foi possível identificar novas possibilidades para o entendimento da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por hidrolases e obter-se resultados preliminares para a construção de coquetéis de enzimas mais eficientes para a obtenção do etanol de segunda geração.

6. Referências Bibliográficas

- ADEMARK, P.; DE VRIES, R. P.; HAGGLUND, P.; STALBRAND, H.; VISSER, J. **Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation.** Eur. J. Biochem., v. 268(10), p. 2982–2990, 2001.
- ALBINANTE, S. R.; PACHECO, E. B. A. V.; VISCONTE, L. L. Y.; TAVARES, M. I. B. **Characterization of banana and coconut fibers by high-resolution nuclear magnetic resonance in the solid state.** v. 22, 2012.
- ALLISON, D. B.; GADBURY, G. L.; HEO, M.; FERNÁNDEZ, J. R.; LEE, C. K.; PROLLA, T. A.; WEINDRUCH, R. **A mixture model approach for the analysis of microarray gene expression data.** Comput. Stat. Data Anal., v. 39, p. 1-20, 2002.
- ANDERSEN, M. R.; SALAZAR, M. P.; SCHAAP, P. J.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; CULLEY, D.; THYKAER, J.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BERKA, R. M.; BRAUS, G. H.; BRAUS-STROMEYER, S. A.; CORROCHANO, L. M.; DAI, Z.; VAN DIJCK, P. W.; HOFMANN, G.; LASURE, L. L.; MAGNUSON, J. K.; MENKE, H.; MEIJER, M.; MEIJER, S. L.; NIELSEN, J. B.; NIELSEN, M. L.; VAN Ooyen, A. J.; PEL, H. J.; POULSEN, L.; SAMSON, R. A.; STAM, H.; TSANG, A.; VAN DEN BRINK, J. M.; ATKINS, A.; AERTS, A.; SHAPIRO, H.; PANGILINAN, J.; SALAMOV, A.; LOU, Y.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; GRIMWOOD, J.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P.; MARTINEZ, D.; VAN PEIJ, N. N. M. E.; ROUBOS, J. A.; NIELSEN, J.; BAKER, S. E. **Comparative genomics of citric-acid producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88.** Genome Res., v. 21, p. 885-897, 2011.
- ANDERSEN, M. R.; VONGSANGNAK, W.; PANAGIOTOU, G.; SALAZAR, M. P.; LEHMANN, L.; NIELSEN, J. **A trispecies *Aspergillus* microarray: comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 105, p. 4387-4392, 2008.
- ARMATA, H. L.; GOLEBIEWSKI, D.; JUNG, D. J.; KO, H. J.; KIM, J. K.; SLUSS, H. K.; **Requirement of the ATM/p53 tumor suppressor pathways for glucose homeostasis.** Mol. Cel. Biol., v. 30, p. 5787-5794, 2010.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. **Transcriptional regulation of plat cell wall degradation by filamentous fungi.** FEMS Microbiol. Rev., v. 29, p. 719-739, 2005.
- ARO, N.; SALOHEIMO, A.; ILME'N, M.; PENTTILA, M. **ACEII, a Novel Transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*.** The Journal of Biol. Chem., v. 276, p. 24309–24314, 2001.

- BATTAGLIA, E.; BENOIT, I.; VAN DEN BRINK, J.; WIEBENGA, A.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; DE VRIES, R. P. **Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level**. BMC Genomics, v. 12, p. 38, 2011.
- BAUER, S.; VASU, P.; PERSSON, S.; MORT, A. J.; SOMERVILLE, C. R. **Development and application of a suite of polysaccharide degrading enzymes for analyzing plant cell walls**. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 103(30), p. 11417–11422, 2006.
- BEGUIN, P. **Molecular biology of cellulose degradation**. Ann. Rev. Microbiol., v. 44, p. 219–248, 1990.
- BENEN, J. A.; KESTER, H. C.; PARENICOVA, L.; VISSER, J. **Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A**. Biochemistry, v. 39 (50), p. 15563–15569, 2000.
- BERGEN, L. G.; MORRIS, N. R. **Kinetics of the nuclear division cycle in *Aspergillus nidulans***. J. Bacteriol. v. 156, p. 155-160, 1983
- BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. **Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties**. J. Biotechnol., v. 57(1:3), p. 151-166, 1997.
- BORASTON, A. B.; BOLAM, D. N.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. **Carbohydrate binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition**. Biochem. J., v. 382 (Pt 3), p. 769–781, 2004.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem., v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011.
- BUSSINK, H. J.; BROUWER, K. B.; DE GRAAFF, L. H.; KESTER, H. C.; VISSER, J. **Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger***. Curr. Genet., v. 20(4), p. 301–307, 1991.

- CALERO-NIETO, F.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G.; HERA, C. **Role of the transcriptional activator XlnR of *Fusarium oxysporum* in regulation of xylanase genes and virulence.** MPMI, v. 20 (8), p. 977–985, 2007.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. **Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation.** J. Appl. Microbiol., v. 103(6), p. 2196–204, 2007.
- CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** Nucleic Acids Res., v. 37, p. D233–D238, Database issue, 2009.
- CARLSON, M. **Glucose repression in yeast.** Current Opin. Microbiol., v. 2, p. 202–7, 1999.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D.M. **Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth.** Plant Journal, v. 3(1), p. 1–30, 1993.
- CASSELTON, L.; ZOLAN, M. **The art and design of genetic screens: filamentous fungi.** Nature Rev., v. 3, p. 683–697, 2002.
- CHAMBERGO, F. S.; BONACCORSI, E. D.; FERREIRA, A. J.; RAMOS, A. S.; FERREIRA JÚNIOR, J. R.; ABRAHÃO-NETO, J.; FARAH, J. P.; EL-DORRY, H. **Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays.** J. Biol. Chem., v. 277, p. 13983–13988, 2002.
- CHAUVEROCHE, M. K.; GHIGO J. M.; D'ENFERT, C. **A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.** Nucleic Acids Res., v. 28, p. E97–E104, 2000.
- CHEN, F.; DIXON, R. A. **Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production.** Nat. Biotechnol., v. 25, p. 759–761, 2007.
- CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R. S.; DANTE, M.; SHERO, J. H.; HIETER, P. **Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors.** Gene., v. 110(1), p. 119–22, 1992.

- COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEISS, R. L.; BORKOVICH, K. A.; DUNLAP, J. C. **A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors.** PNAS, v. 103, p. 10352-10357, 2006.
- CORADETTI, S. T.; CRAIG, J. P.; XIONG, Y.; SHOCK, T.; TIAN, C.; GLASS, N. L. **Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi** PNAS, v. 109 (19), p. 7397–7402, 2012.
- COUGHLAN, M. P. **Cellulases: production, properties and applications.** Biochem. Soc. Trans., v. 13, p. 405–406, 1985.
- COUTINHO, P. M.; ANDERSON, M.; KOLENOVA, K.; VANKUYK, P. A.; BENOIT, I.; GRUBEN, B. S.; TREJO- AGUILAR, B.; VISSER, H.; VAN SOLINGEN, P.; PAKULA, T.; SEIBOTH, B.; BATTAGLIA, E.; AGUILAR- OSORIO, G.; DE JONG, J. F.; OHM, R. A.; AGUILAR, M.; HENRISSAT, B.; NIELSEN, J.; STÅLBRAND, H.; DE VRIES, R. P. **Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.** Fung. Genet. Biol., v. 46, p. S161-S169, 2009.
- CUBERO, B.; SCAZZOCCHIO, C. **Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*.** EMBO J., v. 13, p. 407–415, 1994.
- DAS, R. C.; SHULTZ, J. L. **Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*.** Biotechnol. Prog., v. 3, p. 43–48, 1987.
- DE GROOT, P. W.; BASTEN, D. E.; SONNENBERG, A.; VAN GRIENSVEN, L. J.; VISSER, J.; SCHAAP, P. J. **An endo-1,4-beta-xylanase-encoding gene from *Agaricus bisporus* is regulated by compost-specific factors.** J. Mol. Biol., v. 277(2), p. 273–284, 1998.
- DE SOUZA, C. P.; HASHMI, S. B.; OSMANI, A. H.; ANDREWS, P.; RINGELBERG, C. S.; DUNLAP, J. C.; OSMANI, S. A. **Function analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome.** Plos One, v. 8, p. e58008, 2013.
- DE VRIES, R. P.; NADAL, M.; VAN DEN BRINK, J.; VIVAS-DUARTE, D. A.; STÅLBRAND, H. **Fungal degradation of plant oligo- and polysaccharides.** In: Grunwald P (ed) Carbohydrate modifying enzymes and microorganisms. Pan Stanford publishing Pte. Ltd., Singapore, 2011.

- DE VRIES, R. P.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; HENDRIKS, L.; VAN DE BELT, M.; VISSER, J: **Regulation of the α -glucuronidase-encoding gene (*aguA*) from *Aspergillus niger***. Mol. Genet. Genomics, v. 268, p. 96-102, 2002.
- DE VRIES, R. P.; VISSER, J. ***Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides**. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 65(4), p. 497–522, table of contents, 2001.
- DE VRIES, R. P.; BURGERS, K.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. **A new black *Aspergillus* species, *A. vadensis*, is a promising host for homologous and heterologous protein production**. Appl. Environm. Mic., v. 70, p. 3954–3959, 2004.
- DE VRIES, R. P.; VAN DEN BROECK, H. C.; DEKKERS, E.; MANZANARES, P.; DE GRAFF, L. H.; VISSER, J. **Differential expression of three alpha-galactosidase genes and a single beta-galactosidase gene from *Aspergillus niger***. Appl. Environ. Microbiol., v. 65, p. 2453-2460, 1999a.
- DEDAVID E SILVA, L. A.; LOPES, F. C.; SILVEIRA, S. T.; BRANDELLI, A. **Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology**. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 152(2), p. 295–305, 2009.
- DIAS, F. M.; VINCENT, F.; PELL, G.; PRATES, J. A.; CENTENO, M. S.; TAILFORD, L. E.; FERREIRA, L. M.; FONTES, C. M.; DAVIES, G. J.; GILBERT, H. J. **Insights into the molecular determinants of substrate specificity in glycoside hydrolase family 5 revealed by the crystal structure and kinetics of *Cellvibrio mixtus* mannosidase 5A**. J. Biol. Chem., v. 279(24), p. 25517–25526, 2004.
- DING, S.; GE, W.; BUSWELL, J. A. **Cloning of multiple cellulose cDNAs from *Volvariella volcacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting**. FEMS Microbiol. Lett., v. 263(2), p. 207–213, 2006.
- DITCH, S.; PAULL, T. **The ATM protein kinase and cellular redox signalling: beyond the DNA damage response**. Tren. in Biochem. Sci., v. 37, p. 15-22, 2012.
- DO, B. C., DANG, T. T.; BERRIN, J. G.; HALTRICH, D.; TO, K. A.; SIGOILLOT, J. C.; YAMABHAI, M. **Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-betamannosidase from *Aspergillus niger* BK01**. Microb. Cell Fact., v. 8, p. 59, 2009.

- DONNAN, J. H. **Cell division in *Aspergillus***. J. Cell Sci., v.103, p.599-611, 1992.
- DOWZER, C. E. A.; KELLY, J. M. **Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans***. Mol. Cell Biol., v. 11, p. 5701-5709, 1991.
- DRYSDALE, M. R.; KOLZE, S. E.; KELLY, J. M. **The *Aspergillus niger* catabolite repressor encoding gene, *creA***. Gene, v. 130, p. 241-245, 1993.
- EBANKS, R.; DUPONT, M.; SHARECK, F.; MOROSOLI, R.; KLUEPFEL, D.; DUPONT, C. **Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v. 25, p. 310–314, 2000.
- ESPAGNE, E.; LESPINET, O.; MALAGNAC, F.; DA SILVA, C.; JAILLON, O.; PORCEL, B. M.; COULOUX, A.; AURY, J. M.; SEGURENS, B.; POULAIN, J.; ANTHOUARD, V.; GROSSETETE, S.; KHALILI, H.; COPPIN, E.; DEQUARD-CHABLAT, M.; PICARD, M.; CONTAMINE, V.; ARNAISE, S.; BOURDAIS, A.; BERTEAUX-LECELLIER, V.; GAUTHERET, D.; DE VRIES, R. P.; BATTAGLIA, E.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; HENRISSAT, B.; KHOURY, R. E.; SAINSAARD-CHANET, A.; BOIVIN, A.; PINAN-LUCARRE, B.; SELLEM, C. H.; DEBUCHY, R.; WINCKER, P.; WEISSENBAACH, J.; SILAR, P. **The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina***. Genome Biol., v. 9(5), p. R77, 2008.
- ESPESO, E. A.; PEÑALVA, M. **Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans***. Mol. Microbiol., v. 6, p. 1457-1465, 1992.
- ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; ARST, H. N.; PEÑALVA, M. **A pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene**. EMBO J., v. 12, p. 3947-3956, 1993.
- FILLINGER, S.; CHAVEROCHE, M. K.; SHIMIZU K.; KELLER N.; D'ENFERT C. **cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans***. Mol. Microbiol., v. 44, p. 1001-16, 2002.
- FINN, R. D.; MISTRY, J.; SCHUSTER-BOCKLER, B.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOLLICH, V.; LASSMANN, T.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; DURBIN, R.; EDDY, S. R.; SONNHAMER, E. L.; BATEMAN, A. **Pfam: clans, web tools and services**. Nucleic Acids Res., v. 34, p. D247-D251, 2006.

- FOLEY, K.; BOGUSLAVSKY, S.; KLIP, A. **Endocytosis, recycling, and regulated exocytosis of glucose transporter 4**. *Biochem.*, v. 50, p. 3048–3061, 2011.
- FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N. S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T. D.; ENGLAND, G. J.; KELLEY, A. S.; MEERMAN, H. J.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H. A.; TEUNISSEN, P. J.; YAO, J.; WARD, M. **Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei***. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 31988–31997, 2003.
- GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; CUOMO, C.; MA, L. J.; WORTMAN, J. R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S. I.; BASTURKMEN, M.; SPEVAK, C. C.; CLUTTERBUCK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G. H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G. H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J. H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITA, G. M.; SELKER, E. U.; ARCHER, D. B.; PENALVA, M. A.; OAKLEY, B. R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIERMAN, W. C.; DENNING, D. W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACHS, M. S.; OSMANI, S. A.; BIRREN, B. W. **Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae***. *Nature*, v. 438(7071), p. 1105–1115, 2005.
- GANCEDO, J. M. **The early steps of glucose signalling in yeast**. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 32, p. 673–704, 2008.
- GILBERT, H. J.; STALBRAND, H.; BRUMER, H. **How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation**. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v. 11(3), p. 338–348, 2008.
- GOLDMAN, G. H.; KAUFER, E. ***Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes**. *Fungal Genet. Biol.*, v. 41, p. 428–442, 2004.
- GOLDMAN, G. H.; DOS REIS MARQUES E.; DUARTE RIBEIRO D. C.; DE SOUZA BERNARDES, L. A.; QUIAPIN, A. C.; VITORELLI, P. M.; SAVOLDI, M.; SEMIGHINI, C. P.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W. L.; FERREIRA, L. E.; MOREIRA, J. C.; BOGOSSIAN, A. P.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G.; GOLDMAN, M. H. S. **Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity 988 genes**. *Eukaryot. Cell.*, v. 2, p. 34–48, 2003.

- GOMES, L.; DI BENEDETTO, G.; SCORRANO, L. **During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.** Nat. Cell Biol., v. 13, p. 589–598, 2011.
- GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. **Bioethanol.** Cur. Opinion in Chem. Biol., v. 10, p. 63-67, 2006.
- GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V.; MARKOV, A. V.; USTINOV, B. B.; SEMENOVA, M. V.; SINITSYN, A. P. **Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes.** Biochim. Biophys. Acta., v. 1674 (3), p. 268–281, 2004.
- GYSLER, C.; HARMSSEN, J. A.; KESTER, H. C.; VISSER, J.; HEIM, J. **Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*.** Gene, v. 89(1), p. 101–108, 1990.
- HARMSSEN, J. A.; KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A.; VISSER, J. **Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (pelA): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*.** Curr. Genet., v. 18(2), p. 161–166, 1990.
- HARRIS, S. D. **Morphogenesis in coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores.** Microbiology, v. 145, p. 2747-2756, 1999.
- HARRIS, S. D. **The duplication cycle in *Aspergillus nidulans*.** Fungal Genet. Biol., v. 22, p. 1-12, 1997.
- HARRIS, S. D.; MOMANY, M. **Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm.** Fungal Genet. Biol., v. 41, p. 391-400, 2004.
- HARRIS, S. D.; MORREL, J. L.; HAMER, J. E. **Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis.** Genetics, v. 136, p. 517-532, 1994.
- HASPER, A. A.; VISSER, J.; DE GRAAFF, L. H. **The *Aspergillus niger* transcriptional activator *XlnR*, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression.** Mol. Microbiol., v. 36, p. 193-200, 2000.

- HASPER, A. A.; TRINDADE, L. M.; VAN DER VEEN, D.; VAN OOYEN, A. J. J.; DE GRAAFF, L. H. **Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger***. Microbiology, v. 150, p. 1367-1375, 2004.
- HENRISSAT, B. **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities**. Biochem. J., v. 280(2), p. 309-316, 1991.
- HENRISSAT, B.; CLAEYSSSENS, M.; TOMME, P.; LEMESLE, L.; MORNON, J. P. **Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis**. Gene, v. 81(1), p. 83-95, 1989.
- HERVE, C.; ROGOWSKI, A.; BLAKE, A. W.; MARCUS, S. E.; GILBERT, H. J.; KNOX, J. P. **Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects**. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 107(34), p. 15293-15298, 2010.
- HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. **Cellulase for commodity products from cellulosic biomass**. Curr. Opin. Biotechnol., v. 10, p. 358-364, 1999.
- <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>
- <http://www.food-info.net/pt/qa/qa-wi6.htm>
- IGARASHI, K.; ISHIDA, T.; HORI, C.; SAMEJIMA, M. **Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***. Appl. Environ. Microbiol., v. 74(18), p. 5628-5634, 2008.
- ITO, T.; YOKOYAMA, E.; SATO, H.; UJITA, M.; FUNAGUMA, T.; FURUKAWA, K.; HARA, A. **Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674**. J. Biosci. Bioeng., v. 96(4), p. 354-359, 2003.
- JENSEN, M. H.; OTTEN, H.; CHRISTENSEN, U.; BORCHERT, T. V.; CHRISTENSEN, L. L.; LARSEN, S.; LEGGIO, L. L. **Structural and biochemical studies elucidate the mechanism of rhamnogalacturonan lyase from *Aspergillus aculeatus***. J. Mol. Biol., v. 404(1), p. 100-111, 2010.
- JOJIMA, T.; OMUMASABA, C. A.; INUI, M.; YUKAWA, H. **Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook**. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 85, p. 471-480, 2010.

- JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. **Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities.** *Biofuels Bioprod. Bioref.*, v. 1, p. 119–134, 2007.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIHKARI, L. **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochem.*, v. 40, p. 3519–3525, 2005.
- KAFER, E., **Meiotic e mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations.** *Adv. Genet.*, v. 19, p. 33-131, 1977.
- KAFER, E.; MAY, G. S. **Toward repair pathways in *Aspergillus nidulans*.** In: NICKOLOFF, A.; HOEKSTRA, M. F. (Ed.) **DNA Damage and Repair.** Towota: Human Press, v. 1, cap. 21, p. 477-501, 1998.
- KARLSSON, E. N.; DAHLBERG, L.; TORTO, N.; GORTON, L.; HOLST, O. **Enzymatic specificity and hydrolysis pattern of the catalytic domain of the xylanase *xyn1* from *Rhodothermus marinus*.** *J. Biotechnol.*, v. 60, p. 23–35, 1998.
- KIMURA, T.; SUZUKI, H.; FURUHASHI, H.; ABURATANI, T.; MORIMOTO, K.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. **Molecular cloning, characterization and expression analysis of the *xynF3* gene from *Aspergillus oryzae*.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 66, p. 285–292, 2002.
- KODOF, L. V.; KAUPPINEN, S.; CHRISTGAU, S.; ANDERSEN, L. N.; HELDT-HANSEN, H. P.; DORREICH, K.; DALBOGE, H. **Cloning and characterization of two structurally and functionally divergent rhamnogalacturonases from *Aspergillus aculeatus*.** *J. Biol. Chem.*, v. 269(46), p. 29182–29189, 1994.
- KUBICEK, C. P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; MARTINEZ, D. A.; DRUZHININA, I. S.; THON, M.; ZEILINGER, S.; CASAS-FLORES, S.; HORWITZ, B. A.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, M.; KREDICS, L.; ALCARAZ, L. D.; AERTS, A.; ANTAL, Z.; ATANASOVA, L.; CERVANTES-BADILLO, M. G.; CHALLACOMBE, J.; CHERTKOV, O.; MCCLUSKEY, K.; COULPIER, F.; DESHPANDE, N.; VON DOEHREN, H.; EBBOLE, D. J.; ESQUIVEL-NARANJO, E. U.; FEKETE, E.; FLIPPHI, M.; GLASER, F.; GOMEZ-RODRIGUEZ, E. Y.; GRUBER, S.; HAN, C.; HENRISSAT, B.; HERMOSA, R.; HERNANDEZ-ONATE, M.; KARAFFA, L.; KOSTI, I.; LE CROM, S.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; LUBECK, M.; LUBECK, P. S.; MARGEOT, A.; METZ, B.; MISRA, M.; NEVALAINEN, H.; OMANN, M.; PACKER, N.; PERRONE, G.; URESTI-RIVERA, E. E.; SALAMOV, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B.; SHAPIRO, H.; SUKNO, S.; TAMAYO-RAMOS, J. A.; TISCH, D.; WIEST, A.; WILKINSON, H. H.; ZHANG, M.; COUTINHO, P. M.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; BAKER, S. E.; GRIGORIEV, I. V. **Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*.** *Genome Biol.*, v. 12(4), p. R40, 2011.

- KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. **Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls.** Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., v. 57; p. 45–125, 1997.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** FEMS Microbiol. Rev., v. 23, p. 411–456, 1999b.
- KULMBURG, P.; MATHIEU, M.; DOWZER, C.; KELLY, J.; FELENBOK, B. **Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*.** Mol. Microbiol., v. 7, p. 847–857, 1993.
- LAHJOUI, K.; STORMS, R.; XIAO, Z.; JOUNG, K.B.; ZHENG, Y.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A.; VARIN, L. **Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 75(2), p. 337–346, 2007.
- LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. **Cellulosic fuel ethanol – alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*.** Appl. Biochem. Biotechnol. v. 106, p. 457–469, 2003.
- LEVASSEUR, A.; ASTHER, M.; RECORD, E. **Overproduction and characterization of xylanase B of *Aspergillus niger*.** Can. J. Microbiol., v. 51, p. 177–183, 2005.
- LIU, W.; LU, Y.; MA, G. **Induction and glucose repression of endo-b-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409.** Process Biochem. v. 34, p. 67–72, 1999.
- LOMBARD, V.; BERNARD, T.; RANCUREL, C.; BRUMER, H.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. **A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics.** Biochem. J., v. 432(3), p. 437–444, 2010.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. S. **Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020".** Biomass and Bioen. v. 32, p. 582-595, 2008.

- MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; TERA, G.; KUSUMOTO, K.; ARIMA, T.; AKITA, O.; KASHIWAGI, Y.; ABE, K.; GOMI, K.; HORIUCHI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, M.; DENNING, D. W.; GALAGAN, J. E.; NIERMAN, W. C.; YU, J.; ARCHER, D. B.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; FEDOROVA, N. D.; GOTOH, O.; HORIKAWA, H.; HOSUYAMA, A.; ICHINOMIYA, M.; IGARASHI, R.; IWASHITA, K.; JUVVADI, P. R.; KATO, M.; KATO, Y.; KIN, T.; KOKUBUN, A.; MAEDA, H.; MAEYAMA, N.; MARUYAMA, J.; NAGASAKI, H.; NAKAJIMA, T.; ODA, K.; OKADA, K.; PAULSEN, I.; SAKAMOTO, K.; SAWANO, T.; TAKAHASHI, M.; TAKASE, K.; TERABAYASHI, Y.; WORTMAN, J. R.; YAMADA, O.; YAMAGATA, Y.; ANAZAWA, H.; HATA, Y.; KOIDE, Y.; KOMORI, T.; KOYAMA, Y.; MINETOKI, T.; SUHARNAN, S.; TANAKA, A.; ISONO, K.; KUHARA, S.; OGASAWARA, N.; KIKUCHI, H. **Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae***. *Nature*, v. 438 (7071), p. 1157–1161, 2005.
- MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. ***Microbiol. Mol. Biol. Rev.***, v. 70, p. 583-604, 2006.
- MADHAVAN, A.; SRIVASTAVA, A.; KONDO, A.; BISARIA, V. S. **Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae***. *Crit. Rev. Biotechnol.*; in press.
- MAEDA, H.; SANO, M.; MARUYAMA, Y.; TANNO, T.; AKAO, T.; TOTSUKA, Y.; ENDO, M.; SAKURADA, R.; YAMAGATA, Y.; MACHIDA, M.; AKITA, O.; HASEGAWA, F.; ABE, K.; GOMI, K.; NAKAJIMA, T.; IGUCHI, Y. **Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 65, p. 74-83, 2004.
- MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. F. **Enzymatic properties of two beta-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispota* produced in biopulping conditions**. *J. Appl. Microbiol.*, v. 101(2), p. 480–486, 2006.
- MANDELS, M. **Applications of cellulases**. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 13, p. 414–415, 1985.
- MANTYLA, A.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; LINDBERG, E.; LESKINEN, S.; KALLIO, J.; VEHEMAANPERA, J.; LANTOO, R.; SUOMINEN, P. **Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium thermophile*: a recombinant thermoxylanase for bleaching of kraft pulp**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 76, p. 377–386, 2007.

- MARGOLLES-CLARK, M.; ILMÉ, M.; PENTTILA, M. **Expression patterns of 10 hemicellulase genes from filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** J. Biotechnol., v. 57, p. 167–179, 1997.
- MARMORSTEIN, R.; CAREY, M.; PTASHNE, M.; HARRISON, S. C. **DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex.** Nature, v. 27, p. 408-414, 1992
- MARTENS-UZUNOVA E. S.; SCHAAP P. J. **Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics.** Fungal Genet Biol., v. 46(Suppl 1), p. S170–S179, 2009.
- MARTENS-UZUNOVA, E. S.; ZANDLEVEN, J. S.; BENEN, J. A.; AWAD, H.; KOOLS, H. J.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G.; VAN DEN BERG, J. A.; SCHAAP, P. J. **A new group of exo-acting family 28 glycoside hydrolases of *Aspergillus niger* that are involved in pectin degradation.** Biochem. J., v. 400(1), p. 43–52, 2006.
- MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S. E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P. M.; CULLEN, D.; DANCHIN, E. G.; GRIGORIEV, I. V.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, C. P.; HAN, C. S.; HO, I.; LARRONDO, L. F.; DE LEON, A. L.; MAGNUSON, J. K.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.; PUTNAM, N.; ROBERTSE, B.; SALAMOV, A. A.; SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, C. L.; YAO, J.; BARABOTE, R.; NELSON, M. A.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, C. R.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, D. S.; LUCAS, S. M.; RUBIN, E. M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M.; BRETTIN, T. S.; **Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*).** Nat. Biotechnol., v. 26, p. 553-560, 2008.
- MARTINEZ, D.; LARRONDO, L. F.; PUTNAM, N.; GELPKEM, D.; HUANG, K.; CHAPMAN, J.; HELFENBEIN, K. G.; RAMAIYA, P.; DETTER, J. C.; LARIMER, F.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; BERKA, R.; CULLEN, D.; ROKHSAR, D. **Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78.** Nat. Biotechnol., v. 22(6), p. 695–700, 2004.
- MARUI, J.; KITAMOTO, N.; KATO, M.; KOBAYASHI, T.; TSUKAGOSHI, N. **Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*.** FEBS Letters, v. 528, p. 279-282, 2002.

- MATHIEU, M.; FELENBOK, B. **The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator.** EMBO J., v. 13, p. 4022–4027, 1994.
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Anal. Chem., v. 31, p. 426–428, 1959.
- MOMANY, M.; TAYLOR, I. **Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation.** Microbiology, v. 146, p. 3279–84, 2000.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. **Chemical analysis of Pinus oocarpa wood part I - quantification of macromolecular components and volatile extractives.** Rev Árvore, v. 29, 2005.
- MOZOŁOWSKI, G. A.; Connerton I.F. **Characterization of a highly efficient heterodimeric xylosidase from *Humicola insolens*.** Enzyme Microb. Technol., v. 45(6–7), p. 436–442, 2009.
- MUTTER, M.; BELDMAN, G.; PITSON, S. M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. **Rhamnogalacturonan α -D-galactopyranosyluronohydrolase. An enzyme that specifically removes the terminal nonreducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions of pectin.** Plant Physiol., v. 117(1), p. 153–163, 1998.
- NAYAK, T.; SZEWCZYK, E.; OAKLEY, C. E.; OSMANI, A.; UKIL, L.; MURRAY, S. L.; HYNES, M. J.; OSMANI, S. A.; OAKLEY, B. R. A. **A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*.** Genetics., v. 172, p. 1557–1566, 2006.
- NEHLIN, J. O.; RONNE, H. **Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilm's tumour finger proteins.** EMBO J., v. 9, p. 5701–5709, 1990.
- NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. **Highly efficient gene replacements in *Neurospora crassa* strains deficient for nonhomologous end-joining.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 101, p. 12248–12253, 2004.
- NOZAKI, K.; SEKI, T.; MATSUI, K.; MIZUNO, M.; KANDA, T.; AMANO, Y. **Structure and characteristics of an endo-beta-1,4-glucanase, isolated from *Trametes hirsuta* with high degradation to crystalline cellulose.** Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 71(10), p. 2375–2382, 2007.

- OHM, R. A.; DE JONG, J. F.; LUGONES, L. G.; AERTS, A.; KOTHE, E.; STAJICH, J. E.; DE VRIES, R. P.; RECORD, E.; LEVASSEUR, A.; BAKER, S. E.; BARTHOLOMEW, K. A.; COUTINHO, P. M.; ERDMANN, S.; FOWLER, T. J.; GATHMAN, A. C.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; KNABE, N.; KUES, U.; LILLY, W. W.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; MAGNUSON, J. K.; PIUMI, F.; RAUDASKOSKI, M.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; SCHWARZE, F. W.; VANKUYK, P. A.; HORTON, J. S.; GRIGORIEV, I. V.; WOSTEN, H. Á. **Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune***. Nat. Biotechnol., v. 28(9), p. 957–963, 2010.
- OREJAS, M.; MACCABE, A. P.; PÉREZ-GONZÁLEZ, J. A.; KUMAR, S.; RAMÓN, D. **Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene**. Mol. Microbiol., v. 31, p. 77–184, 1999.
- OREJAS, M.; MACCABE, A. P.; PÉREZ-GONZÁLEZ, J. A.; KUMAR, S.; RAMÓN, D. **The wide-domain carbon catabolite repressor CreA indirectly controls expression of the *Aspergillus nidulans xlnB* gene, encoding the acidic endo β -(1,4)-xylanase X₂₄**. J. Bacteriol., v. 183, p. 1517–1523, 2001.
- OSMANI, S. A.; MIRABITO, P. M. **The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans***. J. Cell Biol., v. 41, p. 401-410, 2004.
- OSMANI, S. A.; MAY, G. S.; MORRIS, N. R. **Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans***. J. Cell Biol., v. 104, p. 1495-1504, 1987.
- PACHECO, T. F. **Produção de etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/producao-de-etanol-primeira-ou-segunda-geracao>, Acesso em 19 Fev 2011.
- PARENICOVA, L.; BENEN, J. A.; KESTER, H. C.; VISSER, J. **pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger***. Eur. J. Biochem., v. 251(1–2), p. 72–80, 1998.
- PEL, H. J.; DE WINDE, J. H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; TURNER, G.; DE VRIES, R. P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M. R.; BENDTSEN, J. D.; BENEN, J. A.; VAN DEN BERG, M.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M. X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; DEBETS, A. J.; DEKKER, P.; VAN DIJCK, P. W.; VAN DIJK, A.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A.J.; D'ENFERT, C.; GEYSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G. S.; DE GROOT, P. W.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; VAN DEN

- HOMBERGH, J. P.; VAN DEN HONDEL, C. A.; VAN DER HEIJDEN, R. T.; VAN DER KAAIJ, R. M.; KLIS, F. M.; KOOLS, H. J.; KUBICEK, C. P.; VAN KUYK, P. A.; LAUBER, J.; LU, X.; VAN DER MAAREL, M. J.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M. A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S. G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; VAN PEIJ, N. N.; RAM, A. F.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C. M.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; WEDLER, H.; WOSTEN, H. A.; ZENG, A. P.; VAN OUYEN, A. J.; VISSER, J.; STAM, H. **Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88.** Nat. Biotechnol., v. 25(2), p. 221–231, 2007.
- PEREZ-GONZALEZ, J. A.; VAN PEIJ, N. N. M. E.; BEZOEN, A.; MACCABE, A. P.; RAMON, D.; GRAFF, L. H. D. **Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans* *xlnD* gene encoding a b-xylosidase.** Appl. Environ. Microb., v. 64, p. 1412–1419, 1998.
- PHAM, T. A.; BERRIN, J. G.; RECORD, E.; TO, K. A.; SIGOILLOT, J. C. **Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: role of a carbohydrate-binding module.** J. Biotechnol. v. 148(4), p. 163–170, 2010.
- POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TEREZ, I. H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Appl Microbiol. Biotechnol., v. 67(5), p. 577–591, 2005.
- POLIZELI, M. L. T. M.; CORRÊA, E. C. P.; POLIZELI, A. M.; JORGE, J. A. **Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and Bioenergy.** Routes to cellulosic ethanol, p. 115-134, 2011
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. **The Genetics of *Aspergillus nidulans*.** Adv. Genet., v. 5, p. 1441-238, 1953.
- RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVIDSON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, J. R., W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. **The path forward for biofuels and biomaterials.** Science, v. 311, p. 484-489, 2006.
- RAMOS, L. P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.** Quim. Nova., v. 26, p. 863–871, 2003.

- REESE, E. T. **History of cellulose program at the US Army Natick development centre.** Biotechnol. Bioeng. Symp., v. 6, p. 9–20, 1976.
- ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. **Foreign gene expression in yeast: a review.** Yeast, v. 8, p. 423–488, 1992.
- RONNE, H. **Glucose repression in fungi.** Trends Genet., v. 11, p. 12-17, 1995.
- ROOSEN, J.; ENGELN. K.; MARCHAL, K.; MATHYS, J.; GRIFFIOEN, G.; CAMERONI E.; THEVELEIN, J. M.; DE VIRGILIO, C.; DE MOOR, B.; WINDERICKX, J. **PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability.** Mol. Microb., v. 55, p. 862–880, 2005.
- ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades.** Revista do BNDES, v. 32; p. 116-155, 2009.
- ROY, P.; LOCKINGTON, R. A.; KELLY, J. M. **CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA.** Fungal Genet. Biol., v. 45, p. 657-670, 2007.
- RUEPP, A.; ZOLLNER, A.; MAIER, D.; ALBERMANN, K.; HANI, J.; MOKREJS, M.; TETKO, I.; GÜLDENER, U.; MANNHAUPT, G.; MÜNSTERKÖTTER, M.; MEWES, H. W. **The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes.** Nucleic Acids Res., v. 32, p. 5539-5545, 2004.
- RUIJTER, G. J. G.; VISSER, J. **Carbon repression in *Aspergilli*.** FEMS Microbiol. Lett., v. 151, p. 103-114, 1997.
- RUIJTER, G. J.; VANHANEN, S. A.; GIELKENS, M. M.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; VISSER J. **Isolation of *Aspergillus niger* creA mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes.** Microbiology, v. 143, p. 2991-2998, 1997.
- SALOHEIMO, A.; ARO, N.; ILME, M.; PENTTILA, M. **Isolation of the ace1 Gene Encoding a Cys2-His2 Transcription Factor Involved in Regulation of Activity of the Cellulase Promoter cbh1 of *Trichoderma reesei*.** The Journal of Biol. Chem., v. 275(8), p. 5817–5825, 2000.

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- SA-PEREIRA, P., PAVEIA, H., COSTA-FERREIRA, M., AND AIRES-BARROS, M. R. **A new look at xylanases: An overview of purification strategies.** Mol. Biotechnol., v. 24, p. 257–281, 2003.
- SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. **High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.** Curr Genet., v. 16(5-6), p. 339-46, 1989.
- SCHLACHER, A.; HOLZMANN, K.; HAYN, M.; STEINER, W.; SCHWAB, H. **Cloning and characterization of the gene for the thermostable xylanase XynA from *Thermomyces lanuginosus*.** J. Biotechnol., v. 49, p. 211–218, 1996.
- SCHMOLL, M.; KUBICEK, C. P. **Regulation of *Trichoderma* cellulose formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A Review.** Acta. Microbiol. Immunol. Hung., v. 50(2–3), p. 125–145, 2003.
- SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações.** 2008. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- SEMIGHINI, C. P.; GOLDMAN, G. H.; HARRIS, S. D. **The DNA damage response of filamentous fungi: novel features associates with a multicellular lifestyle.** Appl Microbiol Biotechnol., v. 5, cap. 5, p.117-139, 2005.
- SEMIGHINI, C. P.; MARINS, M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. **Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by Real-Time Reverse Transcription-PCR assay.** Appl. Environ. Microbiol., v. 68, p. 1351-1357, 2002.
- SHACKELFORD, D. B.; SHAW, R. J. **The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control intumor suppression.** Nat. Reviews, v. 9, p. 563-575, 2009.
- SHROFF, R. A.; O'CONNOR, S. M.; HYNES, M. J.; LOCKINGTON, A. R.; KELLY, J. M. **Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*.** Fungal Genet. Biol., v. 22, p. 28–38, 1997.

- SON, S.; OSMANI, S. A. **Analysis of all protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans* identifies a new mitotic regulator, fcp1.** Eukariot. Cell, v. 8, p. 573-585, 2009.
- STRICKER, A. R.; GROSSTESSNER-HAIN, K.; WÜRLEITNER, E.; MACH, R. L.; **Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*.** Eukaryot Cell, v. 5, p. 2128-2137, 2006.
- STRICKER, A. R., MACH, R. L., DE GRAAFF, L. H. **Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*).** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 78, p. 211-220, 2008.
- SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresour. Technol., v. 83, p. 1–11, 2002.
- SUYKERBUYK, M. E.; SCHAAP, P. J.; STAM, H.; MUSTERS, W.; VISSER, J. **Cloning, sequence and expression of the gene coding for rhamnogalacturonase of *Aspergillus aculeatus*; a novel pectinolytic enzyme.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 43(5), p. 861–870, 1995.
- SUYKERBUYK, M. E, KESTER, H. C, SCHAAP, P. J, STAM, H., MUSTERS, W., VISSER, J. **Cloning and characterization of two rhamnogalacturonan hydrolase genes from *Aspergillus niger*.** Appl. Environ. Microbiol., v. 63(7), p. 2507–2515, 1997.
- TAMAYO, E. N.; VILLANUEVA, A.; HASPER, A. A.; DE GRAAFF, L. H.; RAMÓN, D.; OREJAS, M. **CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*.** Fungal Genet. and Biol., v. 45, p. 984-993, 2008.
- TEEPE, A. G.; LOPRETE, D. M.; HE, Z.; HOGGARD, T. A.; HILL, T. W. **The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*.** Fungal Genet. Biol., v. 44, p. 554-562, 2007.
- TEERI, T. **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases.** Trends Biotechnol., v. 15, p. 160–167, 1997.

- TENKANEN, M.; MAKKONEN, M.; PERTTULA, M.; VIKARI, L.; TELEMAN, A. **Action of *Trichoderma reesei* mannanase on galactoglucomannan in pine kraft pulp.** J. Biotechnol., v. 57(1–3), p. 191–204, 1997.
- TIAN, C.; BEESON, W. T.; IAVARONE, A. T.; SUN, J.; MARLETTA, M. A.; CATE, J. H.; GLASS, N. **Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 106, p. 22157–22162, 2009.
- TURCOTTE, B.; LIANG, X. B.; ROBERT, F.; SOONTORNGUN, N. **Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast.** FEMS Yeast Res., v. 10, p. 2–13, 2010.
- UNICA. União da Indústria de cana-de-açúcar. **Usina pioneira de etanol celulósico coloca Brasil entre líderes globais no uso da nova tecnologia.** Disponível em: <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/usina-etanol-celulosico-brasil-lideres-globais-tecnologia-060213/>. Acesso em: 06 Fev. 2013.
- URBAN, J.; SOULARD, A.; HUBER, A.; LIPPMAN, S.; MUKHOPADHYAY, D.; DELOCHE, O.; WANKE, V.; ANRATHER, D.; AMMERER, G.; RIEZMAN, H.; BROACH, J. R.; DE VIRGILIO, C.; HALL, M. N.; LOEWITH, R. **Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol. Cell., v. 26, p. 663–674, 2007.
- VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. **Fungal enzyme sets for plant polyssacharide degradation.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 91, p. 1477–1492, 2011.
- VAN PEIJ, N. N. M. E.; GIELKENS, M. M. C.; DE VRIES, R. P.; VISSER, J.; DE GRAAFF, L. H. **The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*.** Appl. Environ. Microbiol., v. 64, p. 3615–3619, 1998.
- VAN PEIJ, N. N. M. E.; VISSER, J.; DE GRAAF, L. H. **Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*.** Mol. Microbiol., v. 27, p. 131–142, 1998.
- VLASENKO, E.; SCHULEIN, M.; CHERRY, J.; XU, F. **Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases.** Bioresour. Technol., v. 101(7), p. 2405–2411, 2010.

- WARD, M. ***Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems**
In: STREIPS, U. N. YASBIN, R. E. (Ed.) *Modern Microbial Genetics*. New York: Wiley-Liss Inc, p. 355-496, 1991.
- WARING, R. B.; MAY, G. S.; MORRIS, N. R. **Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes.** *Gene*, v. 79, p. 119-130, 1989.
- WITTEVEEN, C. F.; BUSINK, R.; VAN DE VONDERVOORT, P.; DIJKEMA, C.; SWART, K.; VISSER, J. **L-Arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*.** *Microbiology*, v. 135, p. 2163-2171, 1989.
- WU, P.; PETER, J. M.; HARRIS, R. A. **Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α .** *Biochem. Bioph. Res. Com.*, v. 287, p. 391-396, 2001.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL M. N. **TOR signaling in growth and metabolism.** *Cell.*, v. 124, p. 471-484, 2006.
- www.micro.magnet.fsu.edu
- WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.** *Bioresour. Technol.*, v. 96, p. 1959–1966, 2005.
- XIE, X.; WILKINSON, H. H.; CORREA, A.; LEWIS, Z. A.; BELL-PEDERSEN, D.; EBBOLE, D. J. **Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*.** *Fungal Genet. Biol.*, v. 41, p. 1104- 1119, 2004.
- ZAMAN, S., LIPPMAN, S. I.; ZHAO, X.; BROACH, J. R. **How *Saccharomyces* responds to nutrients.** *Annu. Rev. Genet.*, v. 42, p. 27-81, 2008.
- ZNAMEROSKI, E. A.; CORADETTI, S. T.; ROCHE, C. M.; TSAI, J. C.; IAVARONE, A. T.; CATE, J. H.; GLASS, N. L. **Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins.** *PNAS*, v. 109, p. 6012-6017, 2012.

7. Apêndices

Apêndice A: Artigo Publicado

Artigo: Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. De Souza, W. R*; Gouvêa, P. F*; Savoldi, M.; Malavazi, I.; Bernardes, L. A. S.; Goldman, M. H. S.; de Vries, R. P.; Oliveira, J. V. C.; Goldman, G. H. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4(40), 2011.

(*).These authors contributed equally to this work.

**Biotechnology
for Biofuels**

Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse

de Souza *et al.*

RESEARCH

Open Access

Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse

Wagner R de Souza^{1†}, Paula F de Gouveia^{1†}, Marcela Savoldi¹, Iran Malavazi², Luciano A de Souza Bernardes³, Maria Helena S Goldman⁴, Ronald P de Vries⁵, Juliana V de Castro Oliveira⁶ and Gustavo H Goldman^{1,6*}

Abstract

Background: Considering that the costs of cellulases and hemicellulases contribute substantially to the price of bioethanol, new studies aimed at understanding and improving cellulase efficiency and productivity are of paramount importance. *Aspergillus niger* has been shown to produce a wide spectrum of polysaccharide hydrolytic enzymes. To understand how to improve enzymatic cocktails that can hydrolyze pretreated sugarcane bagasse, we used a genomics approach to investigate which genes and pathways are transcriptionally modulated during growth of *A. niger* on steam-exploded sugarcane bagasse (SEB).

Results: Herein we report the main cellulase- and hemicellulase-encoding genes with increased expression during growth on SEB. We also sought to determine whether the mRNA accumulation of several SEB-induced genes encoding putative transporters is induced by xylose and dependent on glucose. We identified 18 (58% of *A. niger* predicted cellulases) and 21 (58% of *A. niger* predicted hemicellulases) cellulase- and hemicellulase-encoding genes, respectively, that were highly expressed during growth on SEB.

Conclusions: Degradation of sugarcane bagasse requires production of many different enzymes which are regulated by the type and complexity of the available substrate. Our presently reported work opens new possibilities for understanding sugarcane biomass saccharification by *A. niger* hydrolases and for the construction of more efficient enzymatic cocktails for second-generation bioethanol.

Background

Brazil is currently responsible for about 33% of the bioethanol produced worldwide and may play an important role in satisfying future bioethanol demand [1]. Nowadays there are more than 400 plants in operation crushing 625 million tons of sugarcane per year, with approximately one-half used for sugar and the other half used for bioethanol production [2]. In 2010, approximately 27.7 billion liters of bioethanol were produced on 8.0 million hectares of land [2]. The efficiency of sugarcane-to-ethanol production can still be increased through improvements in the agricultural and industrial phases of the production process [1,3,4]. Sugarcane bagasse (SB) contains one-third of the energy in sugarcane and is the source of all the energy needed in

bioethanol mills. The other two-thirds are split between sucrose and the tops and leaves [4]. Presently the production of bioethanol in Brazil relies exclusively on first-generation technologies that are based on the utilization of the sucrose content of sugarcane. If sugarcane trash were collected and used for bioethanol production, it would generate an additional 3,700 to 4,000 L/ha bioethanol (9,700 to 10,000 L/ha total), thus reducing the land use requirement by 33% to 38%. The development of new and efficient technologies for hydrolysis of SB could improve this energetic balance considerably and create the basis for second-generation bioethanol. It is estimated that capital costs associated with lignocellulosic bioethanol are US\$4.00/gallon and that these costs need to be reduced by more than half to be economically sustainable [5,6]. Complete substrate utilization is one of the prerequisites to rendering lignocellulosic ethanol processes economically competitive. This means that all types of sugars in lignocellulose must be converted to ethanol and that microorganisms must be

* Correspondence: ggoldman@usp.br

† Contributed equally

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av do Café S/N, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article

© 2011 de Souza et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

obtained that efficiently perform this conversion under industrial conditions. Lignocellulose is composed of cellulose (40% to 50%), hemicellulose (25% to 35%) and lignin (15% to 20%) [7,8]. Glucose constitutes about 60% of the total sugars available in cellulosic biomaterial. Fermentation of the available sugars in cellulosic biomass presents a unique challenge because of the presence of other sugars, such as xylose and arabinose (C5 sugars). The degree of branching and the identity of the minor sugars in hemicelluloses tend to vary, depending upon the type of plant. The conversion of biomass to usable energy is not economical unless hemicellulose is used in addition to cellulose.

Considering that the costs of cellulases and hemicellulases contribute substantially to the price of bioethanol, new studies aimed at understanding and improving cellulase efficiency and productivity are of paramount importance. Filamentous fungi such as *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) have been shown to produce a wide spectrum of polysaccharide hydrolytic enzymes. They are impressive producers of hydrolytic enzymes already applied in a variety of industrial processes, such as the food, feed, pulp, paper and textile industries. Recently, the genome sequences of *A. niger* and *T. reesei* have become available [9,10]. The *A. niger* and *T. reesei* genomes contain 14,600 and 9,129 genes, among which about 200 and 170, respectively, are involved in polysaccharide degradation. In *A. niger*, the expression of all major cellulases and hemicellulases is coregulated by the same inducer molecule (that is, D-xylose), but the induction mechanisms in *T. reesei* are more diverse. At least four different inducer molecules (that is, D-xylose, xylobiose, sophorose and lactose) have been described, but none of them has the potential to trigger the expression of all main cellulases and hemicellulases [11]. The xylanolytic/cellulolytic system in *A. niger* is regulated through the transcriptional activator XlnR. The *A. niger* *xlnR* transcription factor is a master regulator that activates enzymes of the xylanolytic system, a number of endocellulases and at least two cellobiohydrolases, but not that of β -glucosidase [11]. The major repressor protein regulating the carbon catabolite repression of genes involved in carbon metabolism in *Aspergillus* and *Trichoderma* is CreA [12,13]. Surprisingly, CreA is the only regulatory protein for which mediation of carbon repression has been demonstrated in fungi.

Although the source of cellulases is also other fungal species, enzymatic cocktails based on *T. reesei* dominate the market. However, a comparison of the genome sequences of *T. reesei* [10] and *A. niger* [9] shows that *A. niger* is more versatile in the range of cellulases, hemicellulases and esterases encoded, and the latter two groups of enzymes are likely to become more important

if pretreatment steps become less extensively used. *A. niger* has become a very useful model fungus for basic studies in recent years because it has available annotated genome sequences, gene transfer systems and a variety of regulatory mutants. It is unlikely that commercial cellulases from *A. niger* will supplant those from *T. reesei*. The opportunity afforded by using the *A. niger* system is to provide new knowledge regarding the regulation of hydrolases (especially cellulases, hemicellulases and esterases) and accessory proteins that assist in the saccharification of complex substrates. To understand how enzymatic cocktails that can hydrolyze pretreated SBs can be improved, we used a genomics-based approach to investigate which genes and pathways are transcriptionally modulated during growth of *A. niger* on steam-exploded sugarcane bagasse (SEB). Herein we report the main cellulase- and hemicellulase-encoding genes that show increased expression during growth on SEB. We also sought to determine whether the mRNA accumulation of several SEB-induced genes encoding putative transporters is induced by xylose and repressed by glucose.

Results

Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on steam-exploded sugarcane bagasse

A. niger conidia are able to grow in liquid basic culture medium (BCM without yeast extract and supplemented with 0.5% wt/vol SEB as a carbon source (Figure 1). SEB fragments are not very regular and vary in size (Figure

Figure 1 *Aspergillus niger* growth on SEB. *A. niger* conidia were grown for 24 hours on batch cultivation medium without yeast extract supplemented with 0.5% steam-exploded sugarcane bagasse as carbon source. **(A)** Steam-exploded sugarcane bagasse (SEB) fragments stained with toluidine blue without any inoculation (left panel) and inoculated with *A. niger* and grown for 24 hours at 30°C (right panel). **(B)** Magnification of SEB inoculated with *A. niger* for 24 hours at 30°C. Bars = 20 μ m.

1A, upper panels). After 24 hours of growth, gemlings are able to grow intimately into the SEB fragments, squeezing them (Figures 1A and 1B). As a first step toward verifying the induction of cellulase and hemicellulase production, we evaluated a time course of endo-1,4- β -xylanase (xylanase) and endo-1,4- β -glucanase (cellulase) activity when *A. niger* was grown in the presence of xylose, xylan, SB and SEB as carbon sources (Figure 2). Xylanase activity was higher in xylan than in any of the other three carbon sources, and it was almost absent in SB as single-carbon source (Figure 2A). Cellulase activity was higher in SEB than in any of the other three carbon sources (Figure 2B). Interestingly, cellulase activity was much higher in the presence of xylose than in the presence of xylan (Figure 2B, upper graph). As expected, the physical treatment of SB, that is, SEB, increased xylanase and cellulase activity dramatically (Figure 2, lower graphs). Curiously, during growth on SEB, xylanase and cellulase activity remained at about the same levels from 6 to 36 hours, but cellulase activity

increased at 48 hours (Figure 2, lower graphs). We decided to choose 6, 12 and 24 hours as time points for our microarray analysis, with the aim of understanding early events involved in cellulases and xylanase induction. To gain insight into which hydrolytic enzyme-encoding genes and pathways are influenced by SEB, we determined the transcriptional profile of *A. niger*. We grew *A. niger* on 1% fructose (control) and transferred mycelia to 0.5% SEB as a single-carbon source for 6, 12 and 24 hours. In these experiments, our main aim was to focus on genes that have increased or decreased mRNA expression on SEB compared to the control. We were able to observe about 3,700 genes modulated at at least one time point (1,555 and 2,143 genes with $\log_2$ Cy5/Cy3 ratios ≥ 1 and ≤ 1 , respectively) [GEO: GSE24798] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24798>. The false discovery rate (FDR) was 1.18% ($P = 1\%$; $P = 0.01$) (see Additional file 1, Table S1). These genes are involved in a variety of cellular processes, and they were classified based on Functional

1A, upper panels). After 24 hours of growth, gemlings are able to grow intimately into the SEB fragments, squeezing them (Figures 1A and 1B). As a first step toward verifying the induction of cellulase and hemicellulase production, we evaluated a time course of endo-1,4- β -xylanase (xylanase) and endo-1,4- β -glucanase (cellulase) activity when *A. niger* was grown in the presence of xylose, xylan, SB and SEB as carbon sources (Figure 2). Xylanase activity was higher in xylan than in any of the other three carbon sources, and it was almost absent in SB as single-carbon source (Figure 2A). Cellulase activity was higher in SEB than in any of the other three carbon sources (Figure 2B). Interestingly, cellulase activity was much higher in the presence of xylose than in the presence of xylan (Figure 2B, upper graph). As expected, the physical treatment of SB, that is, SEB, increased xylanase and cellulase activity dramatically (Figure 2, lower graphs). Curiously, during growth on SEB, xylanase and cellulase activity remained at about the same levels from 6 to 36 hours, but cellulase activity

increased at 48 hours (Figure 2, lower graphs). We decided to choose 6, 12 and 24 hours as time points for our microarray analysis, with the aim of understanding early events involved in cellulases and xylanase induction. To gain insight into which hydrolytic enzyme-encoding genes and pathways are influenced by SEB, we determined the transcriptional profile of *A. niger*. We grew *A. niger* on 1% fructose (control) and transferred mycelia to 0.5% SEB as a single-carbon source for 6, 12 and 24 hours. In these experiments, our main aim was to focus on genes that have increased or decreased mRNA expression on SEB compared to the control. We were able to observe about 3,700 genes modulated at at least one time point (1,555 and 2,143 genes with $\log_2$ Cy5/Cy3 ratios ≥ 1 and ≤ 1 , respectively) [GEO: GSE24798] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24798>. The false discovery rate (FDR) was 1.18% ($P = 1\%$; $P = 0.01$) (see Additional file 1, Table S1). These genes are involved in a variety of cellular processes, and they were classified based on Functional

Catalogue (FunCat) database categories <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB> (Additional file 2, Table S2, and Additional file 3, Table S3, list the genes) [14]. Hierarchical clustering showed that these genes fall into six main clusters (Figure 3A). The first

three clusters of genes (C1 to C3; $n = 2,143$ genes) (Figure 3A) showed the lowest expression levels on SEB. FunCat analysis [14] (Additional file 2, Table S2, and Additional file 3, Table S3) of the classified genes in these clusters showed a significant enrichment ($P <$

0.001) for (1) cell growth and morphogenesis, (2) assembly of protein complexes, (3) eukaryotic plasma membrane and (4) degradation of foreign exogenous compounds (Figure 3B). If the unclassified genes were not taken into account, the categories "cell growth and morphogenesis" and "assembly of protein complexes" would comprise 52% and 34% of these gene clusters, respectively (Figure 3B). In the "cell growth and morphogenesis" category, we observed genes involved in cell-cycle progression, such as a number of cyclin-encoding genes (An01g07040, An15g06500 and An07g08520) and cyclin-dependent kinases (An05g00280 and An09g04660). In addition, several genes encoding Ras-like proteins (An14g05530, An11g10320, An15g06650 and An5g00370) and signal transduction proteins involved in cell growth and monitoring nutrient conditions were expressed (G proteins such as An2g08000 and An02g01290 and protein kinases such as mitogen-activated protein kinase (An08g03240) and cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (An07g05060)). These results suggest that there is a reduction in growth progression during the 24-hour incubation with SEB.

The other three clusters of genes (C3 to C6; $n = 1,555$ genes) (Figure 3A) showed the highest expression levels on SEB. FunCat analysis [14] (Additional file 2, Table S2, and Additional file 3, Table S3) of the classified genes in these clusters showed enrichment of (1) C compound and carbohydrate metabolism; (2) lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism; (3) cell death; (4) detoxification; (5) fermentation; (6) the pentose phosphate pathway; (7) animal cell-type differentiation; and (8) ribosome biogenesis (Figure 3C). Once more, if the unclassified genes were not taken into account, the categories "C compound and carbohydrate metabolism," "fermentation" and "pentose phosphate pathway" would comprise 50.36% of these gene clusters (Figure 3C). The categories "lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism" and "detoxification" would comprise 25.18% and 15.28% of these gene clusters, respectively (Figure 3C). We first concentrated our attention on genes encoding cellulases and xylanases whose mRNA accumulation increased when *A. niger* was grown on SEB (Tables 1 and 2). The *A. niger* genome comprises 31 and 36 predicted cellulase- and hemicellulase-encoding genes, respectively [9]. We were able to observe increased expression of 18

Table 1 Predicted *Aspergillus niger* cellulase-encoding genes that have increased mRNA accumulation during growth on steam-exploded sugarcane bagasse compared to growth on fructose reference control

Gene locus	Motifs*			GH family	SP	MS	Description	log ₂ Cy5/Cy3 ratio**		
	Sequence	Location	Orientation					6 hours	12 hours	24 hours
An03g03740				GH1	No	No	β -glucosidase (<i>bgl4</i>)	4.22	3.53	4.04
An11g02100	GGCTAG	249	1	GH1	Yes	No	β -glucosidase			
An15g04800	TTAGCC	-178	-1	GH3	Yes	No	β -1,2-D-glucosidase (<i>b2tom</i>)	1.90	0.37	1.85
An07g07630	GGCTAA	-180	1	GH3	Yes	No	β -glucosidase	4.88	3.67	3.21
An17g00520				GH3	No	No	β -glucosidase precursor (<i>bgluc</i>)	5.34	5.49	5.23
An18g03570				GH3	Yes	Yes	β -glucosidase (<i>bglI</i>)	6.06	3.55	4.31
An11g00200				GH3	Yes	No	β -glucosidase (<i>bglN</i>)	6.23	5.34	5.94
An11g06090	CTAGCC GGCTAA	-69 -482	-1 1	GH3	Yes	No	β -glucosidase 2 (<i>bgl2</i>)	5.44	4.62	3.19
An03g01050				GH5	Yes	No	Endo- β -1,4-glucanase	3.75	0.92	2.58
An01g11670				GH5	Yes	No	Endo- β -1,4-glucanase A (<i>eglA</i>)	6.25	6.97	6.86
An07g08950	GGCTAA	-128	1	GH5	Yes	No	Endo- β -1,4-glucanase B	8.21	8.03	8.16
An08g01760	TTAGCC	-185	-1	GH6	Yes	No	Exocellulohydrolase	5.07	3.47	2.73
An12g02220				GH6	Yes	Yes	Cellulose 1,4- β -cellobiosidase II (<i>cbh2</i>)	6.03	6.15	7.36
An07g09330				GH7	Yes	No	1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase A precursor (<i>cbhA</i>)	5.95	5.83	3.89
An01g11660	GGCTAG TTAGCC	-417 -157	1 1	GH7	Yes	No	1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase B precursor (<i>cbhB</i>)	7.43	6.91	6.58
An14g02760				GH12	Yes	No	Endoglucanase A (<i>eglA</i>)	7.88	6.85	6.35
An12g04610				GH61	Yes	No	Similarity to endoglucanase IV (<i>egl4</i>)	6.78	6.40	6.59
An01g01870	GGCTAA	-394	1	GH74	Yes	No	Avicelase III	4.69	4.52	4.15

GH = glycoside hydrolase; SP = signal peptide; MS = mass spectrometry; log₂ Cy5/Cy3 ratio = base 2 logarithm ratio of cyanine 5 to cyanine 3. *Search of the promoter regions (500 bp upstream of putative translational start codon) of the displayed genes for the *A. niger* XlnR-binding sites containing either 5'-TTAGCC-3' or 5'-GGCTAG-3'. Location is relative to start codon. **log₂ Cy5/Cy3 ratio observed in microarray hybridizations.

Table 2 Predicted *Aspergillus niger* hemicellulase-encoding genes that have increased mRNA accumulation during growth on steam-exploded sugarcane bagasse compared to growth on fructose reference control

Gene locus	Sequence	Motifs*		GH family	SP	MS	Description	log ₂ Cy5/Cy3 ratio**		
		Location	Orientation					6 hours	12 hours	24 hours
An12g01850				GH2	No		β-mannosidase	2.03	1.63	1.01
An01g09960	GGCTAA	-147 -133	1	GH3	Yes	No	Exo-1,4-β-xylosidase (<i>xlnD</i>)	6.70	5.85	5.51
An17g00300	TTAGCC	-487-9	-1	GH3	Yes	No	Bifunctional xylosidase-arabinosidase (<i>xarB</i>)	7.04	6.42	4.80
An03g00940	GGCTAA	-495 -288	1	GH10	Yes	Yes	Endo-1,4-β-xylanase A precursor (<i>xynA</i>)	6.77	5.86	5.52
An01g14600				GH11	Yes	No	Endo-1,4-β-xylanase	1.88	1.66	2.17
An15g04550	GGCTAA	-322	1	GH 11	Yes	No	Xylanase A (<i>xynA</i>)	6.21	6.21	6.19
	TTAGCC	-270	-1							
An01g00780	GGCTAA	-216 124	1	GH11	Yes	Yes	Endo-1,4-β-xylanase B (<i>xynB</i>)	8.86	8.36	8.24
An01g03340	GGCTAA	-244	1	GH12	Yes	No	Xyloglucan-specific endo-β-1,4-glucanase	5.79	5.29	5.05
An14g01800				GH27	Yes	No	α-galactosidase D	3.01	1.63	1.23
An06g00170				GH27	Yes	No	α-galactosidase A	3.25	2.57	5.62
An02g11150				GH27	Yes	No	α-galactosidase (<i>aglB</i>)	4.16	2.00	1.38
An11g03120				GH43	No	No	Endo-1,4-β-xylanase (<i>xynD</i>)	2.09	1.70	1.95
An02g00140				GH43	No	No	Xylan-1,4-β-xylosidase (<i>xynB</i>)	2.88	1.43	1.34
An09g01190				GH43	Yes	No	Endo-1,5-α-arabinanase (<i>abnA</i>)	6.54	4.31	4.78
An08g01710				GH51	No	No	α-L-arabinofuranosidase (<i>abfA</i>)	5.69	2.66	4.38
An15g02300	CTAGCC	-39	-1	GH54	Yes	No	Arabinofuranosidase B (<i>abfB</i>)	7.94	3.43	2.49
	TTAGCC	-473 -421	-1							
An03g00960	GGCTAA	-346	1	GH62	Yes	No	1,4-β-D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase (<i>axhA</i>)	6.13	6.05	6.00
An14g05800	GGCTAG	-412	1	GH67	Yes	No	α-glucuronidase (<i>aguA</i>)	9.12	8.36	7.72
	GGCTAA	-277								
An16g02760	GGCTAA	-245	1	GH95	No	No	α-fucosidase			
An12g02550	TTAGCC	-500	-1	CE1	Yes	No	Feruloyl esterase	7.18	7.24	7.87
An12g05010				CE1	Yes	No	Acetyl xylan esterase (<i>axeA</i>)	8.31	7.72	7.77

GH = glycoside hydrolase; SP = signal peptide; MS = mass spectrometry; log₂ Cy5/Cy3 ratio = base 2 logarithm ratio of cyanine 5 to cyanine 3. *Results of a search of the promoter regions (500 bp upstream of the putative translational start codon) of the displayed genes for the *A. niger* XlnR binding sites containing either 5'-TTAGCC-3' or 5'-GGCTAG-3'. Location is relative to the start-codon. **log₂ Cy5/Cy3 ratio observed in the microarray hybridizations. In the Orientation column, the numbers that were missing are the same.

(58%) and 21 (58%) cellulase- and hemicellulase-encoding genes, respectively, during growth on SEB (Tables 1 and 2). Interestingly, there is increased mRNA accumulation of several genes involved in fermentation, such as alcohol dehydrogenase (*AlcB*; An01g12170) and lactate dehydrogenase (*Ldh*; An11g09520), raising the possibility that lactate and alcohol fermentation occurs concomitantly with biomass saccharification. As expected, there is an intense modulation of several genes involved in C compound and carbohydrate metabolism and in the pentose phosphate pathway, which reflects the broad transport and metabolization of different classes of sugars during biomass utilization.

Validation of the microarray hybridization analysis

To validate some of our findings, we chose eight different genes from our microarray analysis whose mRNA

shows increased accumulation when *A. niger* has grown on SEB. We designed Lux fluorescent probes and used real-time RT-PCR analysis to quantify their expression in *A. niger* grown on SEB for 6, 12 and 24 hours (Table 3). The measured quantity of a specific gene's mRNA in each of the treated samples was normalized using the comparative threshold (C_t) values obtained for the actin mRNA amplifications run in the same plate. We also used β-tubulin as a normalizer and observed similar results (data not shown). The results were expressed as the number of times the genes showed increased expression when *A. niger* was grown on SEB compared to the control grown on fructose. We evaluated the mRNA accumulation of *xlnD* (An01g0960), encoding an exo-1,4-β-xylosidase; *xynB* (An01g00780), encoding an endoxylanase; *eglA* (An01g11670), encoding an endoglucanase; *eglB* (An07g08950), encoding an

Table 3 Gene expression measured by real-time RT-PCR of genes encoding *Aspergillus niger* cellulases, hemicellulases, xylose reductase and *xlnR* during growth on steam-exploded sugarcane bagasse

Gene and locus	Control (fructose)	SEB 6 hours	SEB 12 hours	SEB 24 hours
<i>cbhA</i> (An07g09330)	0.0086 ± 0.0008	0.3178 ± 0.0104	0.0477 ± 0.0013	0.0284 ± 0.0066
<i>cbhB</i> (An01g11660)	0.0023 ± 0.0000	4.2126 ± 0.1298	1.2376 ± 0.0629	1.6419 ± 0.3598
<i>eglA</i> (An01g11670)	0.0008 ± 0.0000	1.4762 ± 0.2621	0.7261 ± 0.0368	0.3397 ± 0.0740
<i>eglB</i> (An07g08950)	0.0062 ± 0.0004	3.7060 ± 0.0112	0.6213 ± 0.0248	0.1227 ± 0.0263
<i>xynB</i> (An01g00780)	0.0039 ± 0.0001	153.0746 ± 2.8399	9.8474 ± 0.6560	6.4386 ± 1.5611
<i>xlnD</i> (An01g09960)	0.0110 ± 0.0003	15.4472 ± 0.1495	0.7838 ± 0.0036	0.0617 ± 0.0149
<i>xlnR</i> (An15g05810)	0.76 ± 0.00	5.93 ± 0.62	1.71 ± 0.06	2.35 ± 0.24
<i>xylA</i> (An01g03780)	0.33 ± 0.02	268.58 ± 6.22	45.84 ± 1.98	36.40 ± 1.11

SEB = steam-exploded sugarcane bagasse. The mRNA accumulation of several *A. niger* genes during growth on SEB. Cultures were grown for 24 hours at 30°C on batch cultivation medium (BCM) + 50 mM fructose, then the mycelial mass was transferred to BCM without yeast extract + steam-exploded sugarcane bagasse and grown for 6, 12 and 24 hours at 30°C. Real-time RT-PCR was used to quantify the mRNA. The measured quantity of a specific gene mRNA in each of the treated samples was normalized using the comparative threshold (C_t) values obtained for the actin mRNA amplifications run in the same plate. The relative quantitation of specific gene and actin gene expression was determined by a standard curve (that is, C_t values plotted against logarithm of DNA copy numbers). The results of four sets of experiments were combined for each determination. Data presented are means ± SD. The values represent the cDNA concentration of a specific gene divided by the actin cDNA concentration.

endoglucanase; *cbhA* (An07g09330), encoding a cellobiohydrolase; and *cbhB* (An01g11660), encoding a cellobiohydrolase. In addition, we quantified the mRNA accumulation of *xylA* (An01g03780) and *xlnR* (An15g05810), which encode xylose reductase and the master transcription factor responsible for cellulase and xylanase induction in *A. niger*, respectively. Both genes showed greater expression during growth on SEB in our hybridization analysis (Additional file 3, Table S3). Interestingly, all genes tested showed increased mRNA accumulation at 6 hours, but then their mRNA accumulation decreased at 12 and 24 hours. However, all these genes showed, to different extents, increased mRNA accumulation when *A. niger* was grown on SEB compared to the noninducing conditions, that is, growth on fructose (Table 3). Thus it seems that our microarray hybridization approach is capable of providing information about *A. niger* gene expression modulation with a considerably high level of confidence.

Genes encoding putative transporters

We observed intense modulation of mRNA accumulation of several genes that encode predicted transporters potentially involved with sugar transport (see Additional file 3, Table S3). We concentrated our attention on seven of them that showed increased mRNA accumulation in the presence of SEB (Table 4). As a preliminary step toward assessing the function of some of these transporter-encoding genes, we performed real-time RT-PCR analysis. We validated the increased mRNA accumulation in the presence of SEB, and all of the genes showed increased mRNA accumulation to different extents when growth was induced by SEB (Table 5). Our laboratory is interested in identifying transporter-encoding genes that could be involved in xylose-transport. Thus we investigated whether the mRNA accumulation of these seven genes is modulated by xylose and affected by glucose (Table 6). All seven of these genes are induced by xylose and

Table 5 Gene expression measured by real-time RT-PCR of genes encoding *Aspergillus niger* putative transporters during growth on steam-exploded sugarcane bagasse

Gene locus	Control (fructose)	SEB 6 hours	SEB 12 hours	SEB 24 hours
An01g00850	0.064 ± 0.007	1.41 ± 0.01	1.38 ± 0.29	0.10 ± 0.02
An06g00260	0.21 ± 0.03	0.89 ± 0.09	1.70 ± 0.30	0.22 ± 0.02
An06g00620	2.25 ± 0.25	8.96 ± 0.93	8.87 ± 1.15	1.49 ± 0.19
An11g03700	0.396 ± 0.017	2.49 ± 0.08	3.02 ± 0.32	0.094 ± 0.019
An12g09270	0.96 ± 0.08	23.40 ± 3.50	4.28 ± 0.64	3.17 ± 0.61
An15g04270	0.036 ± 0.004	0.037 ± 0.006	0.13 ± 0.02	0.110 ± 0.009
An15g05440	0.021 ± 0.004	0.071 ± 0.002	0.041 ± 0.007	0.003 ± 0.001

SEB = steam-exploded sugarcane bagasse. The mRNA accumulation of several *A. niger* transporter-encoding genes during growth on SEB is shown. Cultures were grown for 24 hours at 30°C on batch cultivation medium (BCM) + 50 mM fructose, and the mycelia were transferred to BCM without yeast extract + SEB and grown for 6, 12, and 24 hours at 30°C. Real-time RT-PCR was used to quantify the mRNA. The measured quantity of a specific gene mRNA in each of the treated samples was normalized using the comparative threshold (C_t) values obtained for the actin mRNA amplifications run in the same plate. The relative quantitation of a specific gene and actin gene expression was determined by drawing a standard curve (that is, C_t values plotted against logarithm of DNA copy numbers). The results of four sets of experiments were combined for each determination. Data presented are means ± SD. The values represent the cDNA concentration of a specific gene divided by the actin cDNA concentration.

Table 4 Predicted *Aspergillus niger* transporter-encoding genes that have increased mRNA accumulation during growth on steam-exploded sugarcane bagasse compared to growth on fructose reference control

Gene locus	Motifs*			Description	log ₂ Cy5/Cy3 ratio**		
	Sequence	Location	Orientation		6 hours	12 hours	24 hours
An01g00850	CTAGCC GGCTAA	-376 -385	-1 1	Similarity to xylose permease (<i>xyf1</i>)	4.04	3.91	3.79
An06g00260	CTAGCC	-49	-1	Strong similarity to hexose transporter (<i>hxt5</i>)	5.87	4.36	6.23
An06g00620				Strong similarity to α -glucoside-hydrogen symporter (<i>mal11</i>)	7.19	4.73	5.96
An11g03700				Strong similarity to hexose transporter (<i>hxt1</i>)	1.33	1.97	2.64
An12g09270	GGCTAA	-356	1	Strong similarity to lactose permease (<i>lac12</i>)	3.52	4.44	2.94
An15g04270				Strong similarity to quinate transport protein (<i>gutD</i>)	5.07	6.02	8.29
An15g05440	TTAGCC	-6	-1	Strong similarity to high-affinity glucose transporter (<i>hgt1</i>)	3.85	3.02	2.86

log₂ Cy5/Cy3 ratio = base 2 logarithm ratio of cyanine 5 to cyanine 3. *Results of a search of the promoter regions (500 bp upstream of putative translational start codon) of displayed genes for *A. niger* XlnR-binding sites containing either 5'-TTAGCC-3' or 5'-GGCTAG-3'. Location relative to start codon. **log₂ Cy5/Cy3 ratio observed in microarray hybridizations.

repressed by glucose to different extents (Table 6). Taken together, these results suggest that we were able to identify *A. niger* transporter-encoding genes that, based on their expression profiles, could be promising candidate xylose transporters.

In silico identification of XlnR-binding motifs

The functional *A. niger* XlnR-binding sites identified contain either 5'-TTAGCC-3' or 5'-GGCTAG-3' [15-17]. A search of the promoter regions (500 bp upstream of the putative translational start codon) of the 1,516 genes with increased mRNA accumulation (Additional file 3, Table S3) revealed 461 genes with promoter regions containing at least one of these two binding sites and 63 genes that contain multiple binding sites (Additional file 4, Table S4). At least 15 putative transporter encoding genes, including An01g00850, An06g00260, An12g09270 and An15g05440, were tested for xylose induction (Additional file 4, Table S4, and Tables 4 through 6). The genes An06g00260, An12g09270, An01g00850 and

An15g05440 were induced by xylose and repressed by glucose, suggesting that their putative XlnR-binding sites could be functional (see Table 6 and "Genes encoding putative transporters" section). Putative XlnR-binding sites were also found in the promoter regions of three genes encoding transcription factors (An05g00480 (*stuA*), encoding a transcription factor involved in differentiation; An01g08050 (*uaY*) a positive regulator of purine utilization; and An07g08880 (*cys-3*), a positive sulfur regulator). We observed XlnR-binding sites in the promoter regions of two genes encoding proteins that participate in the pentose catabolic and phosphate pathways (An01g03740 (D-xylose reductase) and An07g03160 (transaldolase), respectively). A search of the promoter regions of the genes encoding cellulases and hemicellulases (Tables 1 and 2) revealed that 8 (of a total of 18 cellulase-encoding genes) and 11 (of a total of 21 hemicellulase-encoding genes) promoters, respectively, contained at least one binding site, and that among those, 5 promoters had multiple binding sites.

Table 6 Gene expression measured by real-time RT-PCR of genes encoding *Aspergillus niger* putative transporters in presence of xylose or xylose and glucose

Gene locus	Control (fructose)	Xylose 1 hour	Xylose 4 hours	Xylose + glucose 1 hour	Xylose + glucose 4 hours
An06g00620	0.08 ± 0.03	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.05	0.003 ± 0.00	0.03 ± 0.01
An15g04270	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
An15g05440	0.34 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.56 ± 0.12	0.09 ± 0.05	0.19 ± 0.05
An11g03700	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.009 ± 0.001	0.05 ± 0.01
An12g09270	0.29 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.010 ± 0.001	0.20 ± 0.05
An01g00850	0.25 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.45 ± 0.17
An06g00260	0.70 ± 0.03	2.40 ± 0.22	2.30 ± 0.64	0.25 ± 0.01	0.36 ± 0.07

The mRNA accumulation of several *A. niger* transporter-encoding genes during growth on minimal medium (MM) + xylose or MM + xylose + glucose. Cultures from the *A. niger* N402 strain were grown for 24 hours at 30°C in batch cultivation medium (BCM) + 50 mM fructose and the mycelia were transferred to either BCM without yeast extract + 1% xylose or BCM without yeast extract + 1% xylose + 2% glucose and grown for one and four hours at 30°C. Real-time RT-PCR was used to quantify mRNA. The measured quantity of a specific gene mRNA in each of the treated samples was normalized using the comparative threshold (C_t) values obtained for the actin mRNA amplifications run in the same plate. The relative quantitation of a specific gene and actin gene expression was determined by drawing a standard curve [that is, C_t values plotted against logarithm of DNA copy numbers]. The results of four sets of experiments were combined for each determination. Data presented are means ± SD. The values represent the cDNA concentration of a specific gene divided by the actin cDNA concentration.

Secretome analysis of *Aspergillus niger* grown on steam-exploded sugarcane bagasse

To develop a preliminary notion of the proteins secreted by *A. niger* during growth on SB, we ran the proteins from the supernatant of a 24-hour culture on a polyacrylamide gel (data not shown). Nine bands of this gel were excised, and the proteins were eluted, digested with trypsin and identified by tandem mass spectrometry (MS-MS) (Table 7). Within these nine bands, we were able to identify seventeen different proteins that could be grouped into four different classes: (1) cellulases ($n = 5$), (2) xylanases and xylan hydrolysis-related enzymes ($n = 7$), (3) miscellaneous hydrolytic enzymes ($n = 2$) and (4) proteases ($n = 3$). Only three of the genes encoding these proteins were nonmodulated in our microarray analysis (glucan 1,4- α -glucosidase (*gluA*), An03g06550; tripeptidyl peptidase (unnamed gene), An14g02470; and acid α -amylase (*aamA*), An11g03340). All of the other proteins had corresponding positively modulated genes in our microarray analysis (see Additional file 3, Table S3).

Discussion

Sugarcane biomass residues are produced in great amounts in several countries. In Brazil, sugarcane production is remarkable because 100% of bioethanol

production as a biofuel is derived from sugarcane through sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. This process uses the sucrose accumulated in the sugarcane xylem and has conventionally been called "first-generation bioethanol." This ethanol corresponds to only one-third of the energy that can be extracted from sugarcane. The other two-thirds, derived from sugarcane tops, leaves and bagasse, are resistant to direct *S. cerevisiae* fermentation because this organism is not able to produce hydrolytic enzymes to degrade celluloses and hemicelluloses. In contrast, filamentous fungi have the ability to produce great amounts of hydrolytic enzymes. In this sense, enzymatic cocktails based on those enzymes have been proposed as an alternative method to break the resistance of those residues to fermentation. No detailed analysis has been published to date about the composition and structure of SB. However, it is quite likely that the composition and structure of celluloses (for example, the crystalline structure, number and extent of fibers) and hemicelluloses (for example, branching and different pentose concentrations) in SB are different from those of other biomass sources, such as wheat straw. Thus there is still a need to understand SB composition and structure and the enzymes necessary to completely hydrolyze it.

Table 7 Protein identification by mass spectrometry from *Aspergillus niger* supernatants grown for 24 hours on steam-exploded sugarcane bagasse

Sample label	Protein name	Gene locus	NCBI GEO accession number	Theoretical molecular mass (kDa)	Score	Sequence coverage (%)	GE level (log ₂ Cy5/Cy3)
1	β -glucosidase	An18g03570	[GEO:215260053]	90	107	16	2.56 $\pm$ 0.03
1	Xylosidase (XlnD)	An01g09960	[GEO:145230215]	87	176	18	2.10 $\pm$ 0.05
2	Glucan 1,4- α -glucosidase (<i>GluA</i>)	An03g06550	[GEO:145235763]	68	264	40	ND
2	Hypothetical protein	An14g02470	[GEO:145249068]	65	63	15	ND
3	1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase B (<i>CbhB</i>)	An01g11660	[GEO:145235763]	56	264	40	6.59 $\pm$ 0.15
3	Acid α -amylase	An11g03340	[GEO:145243632]	55	63	13	ND
3	α -N-arabinofuranosidase B	An15g02300	[GEO:1168267]	52	256	23	7.94 $\pm$ 0.10
4	1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase A	An07g09330	[GEO:74698499]	48	158	12	3.89 $\pm$ 0.20
4	Candidate cellulose 1,4- β -cellobiosidase II (<i>Cbh2</i>)	An12g02220	[GEO:145246118]	48	89	18	4.37 $\pm$ 0.05
5	Aspergillopepsin A	An14g04710	[GEO:1709632]	41	126	23	5.83 $\pm$ 0.09
6	Endo-1,4- β -xylanase A precursor	An03g00940	[GEO:145234695]	35	219	67	3.64 $\pm$ 0.06
6	1,4- β -D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase (<i>AxaA</i>)	An03g00960	[GEO:145234699]	35	127	37	4.03 $\pm$ 0.01
6	Endo-1,4- β -xylanase C	An03g00940	[GEO:292495635]	35	230	57	3.64 $\pm$ 0.06
6	Protease B	An14g04710	[GEO:1585070]	34	136	38	5.83 $\pm$ 0.09
7	Chain A, crystal structure of ferulic acid esterase	An09g00120	[GEO:48425840]	28	105	40	6.17 $\pm$ 0.99
8	Endoglucanase A	An14g02760	[GEO:289595328]	25	99	22	4.36 $\pm$ 0.30
9	Xylanase	An01g00780	[GEO:13242071]	11	99	78	8.29 $\pm$ 0.04

NCBI GEO = National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus; kDa = kilodaltons; GE = gene expression; log₂ Cy5/Cy3 ratio = base 2 logarithm ratio of cyanine 5 to cyanine 3; ND = no data. Data presented in right-hand column are means $\pm$ SD. Score column refers to Mowse scoring algorithm [45].

In our present study, we investigated the transcriptional response of *A. niger* strain N402 grown on pretreated SB. The genome annotation of this strain was used for the microarray slides. However, this strain is more closely related to the *A. niger* genomic DNA strain 3528.7 (ATCC 1015; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) [GenBank:X52521], whose genome was recently published [18]. Unfortunately, the genome sequence of ATCC 1015 was not available when we started this project, thus we were not able to use it for the annotated genes for the microarray design. Our microarray analysis revealed about 3,700 genes differentially expressed in *A. niger* grown on SEB. The FunCat database functional annotation approach was used to determine whether distinct functional groups of genes were overrepresented within our data set. This analysis revealed "C compound and carbohydrate metabolism" as the most significantly enriched class (Additional file 2, Table S2). More than 50% of genes predicted in the genome of *A. niger* related to cellulases and xylanases were upregulated on SEB, and several of them were independently confirmed by real-time RT-PCR and mass spectrometry. There is considerable interest in the investigation of genes regulated at the transcriptional level during cellulosic biomass degradation by *A. niger* or *T. reesei* [19-22]. However, in all these previously published reports, the inducers were single-carbon sources and not complex substrates such as SB. An exception is an article reporting transcriptional profiling when *Neurospora crassa* was cultured on ground *Miscanthus giganteus* stems as the sole carbon source [23]. In comparing the data produced in our present work with the available expression data derived from *N. crassa* grown on *M. giganteus*, we observed that cellulases and hemicellulases present similar expression patterns, whereas the hydrolases specific to branching groups of the xylan backbone display less overlap in the compared systems. This difference could be attributed to the number of hydrolases, which vary widely among filamentous fungi. The *N. crassa* genome is predicted to be more limited in plant biomass degradation, with about 100 genes encoding hydrolases, whereas more than 170 could be identified in *A. niger* [9,10], suggesting that the latter fungus may utilize a wider variety of polysaccharide structures as its carbon source. Furthermore, a wide variety of glycosyl hydrolase (GH) families and member numbers are present in each GH family among fungi with genome sequences available [24,25]. Among the GH3 family, five members in the *N. crassa* genome and at least seventeen in the *A. niger* genome have been identified to date [9]. Only one member of the GH3 family has been detected in the *N. crassa* transcriptome (NCU00810), but our analysis revealed that eight members of the GH3 family are upregulated in *A.*

niger grown on SEB (An15g04800, An07g07630, An17g00520, An18g03570, An11g00200 and An11g06090 (β -glucosidases), and An01g09960 and An017g00300 (xylosidases)). Moreover, the differential expression of hydrolases specific to xylan branching chains found in *A. niger* could be due to differences in the cell wall structures of sugarcane and *Miscanthus*. However, when we compared 149 *N. crassa* genes showing enrichment on *M. giganteus* (FunCat analysis of genes showing enrichment mainly for C compound and carbohydrate metabolism; see Support Information Dataset 1 published by Tian et al. [23]) with the whole *A. niger* SEB data set (Additional file 3, Table S3), we observed that 59% of *N. crassa* genes have corresponding *A. niger* homologues with mRNA accumulation also modulated on SEB (Additional file 5, Table S5). For example, genes encoding putative transporters that could be involved in carbohydrate transport, such as An1503940, An14g01600 and An12g07450 (*N. crassa* NCU04963, NCU05853 and NCU10021, respectively), have increased mRNA accumulation in the presence of both SEB and *Miscanthus* (Additional file 5, Table S5). Genes involved in the metabolism of pentoses, such as An01g10920 and An12g00030 (L-arabinitol 4-dehydrogenase (*N. crassa* NCU00643) and xylitol dehydrogenase (*N. crassa* NCU00891), respectively), also have increased mRNA accumulation in both substrates (Additional file 5, Table S5). These data strongly suggest that although diverse biomasses could have a specific impact on gene expression, some general features of these different residues affect mRNA accumulation in different filamentous fungi. We have also identified many genes whose expression level increased during growth on SEB and which encode proteins of unknown function that are conserved in other cellulolytic fungi (data not shown). Further deletion analysis of these genes may provide more information about their function.

D-xylose, the main component of xylan backbone, and other pentoses derived from xylan branching chains, such as arabinose, are assimilated by the pentose phosphate pathway. As proposed by Witteveen et al. [26], pentose catabolism in *A. niger* includes a reduction and oxidation step leading to D-xylulose, which is converted to D-xylulose-5-phosphate and enters the pentose phosphate pathway. We found a significant increase in mRNA accumulation of the genes encoding these enzymes (xylose reductase (An01g03740), xylitol dehydrogenase (An08g09380) and D-xylulokinase (An07g03140)) during growth of *A. niger* on SEB. These data are supported by promoter analysis of the genes with putative binding sites for XlnR (reported herein and by Foreman et al. [19]) and by the induction of their expression when *A. niger* grows on xylose [19]. Furthermore, the FunCat database classification "Pentose-phosphate pathway" (PPP) was

represented in our analysis, suggesting that this complete catabolic pathway is upregulated when *A. niger* grows on SEB. Hasper et al. [27] showed that XlnR also regulates D-xylose reductase (*xyrA*), a gene from the pentose catabolic pathway, and it remains to be determined whether regulation at the mRNA level of other genes of the PPP is also XlnR-mediated.

Genes related to carbohydrate transport were also identified in the category "C compound and carbohydrate metabolism." The degradation of a complex biomass results in products such as glucose, cellobiose, xylobiose and xylose. Those products need to be transported into the fungal cytoplasm to be metabolized. Hence the upregulation of these genes should be required for better utilization of different sugars released from SB degradation. Our laboratory is interested in identifying transporter-encoding genes that could be involved in xylose transport. Toward this end we selected seven transporter-encoding genes and validated their expression levels by real-time RT-PCR. To check the specificity of these transporters, we tested genes with expression induced by xylose and repressed by glucose. We found that all of them were induced by SEB and showed increased mRNA accumulation when xylose was used as a single-carbon source. *S. cerevisiae* is a very poor xylose utilizer [28,29], and construction of strains able to transport xylose and/or other pentoses more efficiently by heterologous expression of these *A. niger* transporters may improve industrial fermentation of biomass hydrolytic products. None of these transporters or their homologues in other filamentous fungi have been characterized.

Nutrient sensing and signaling via pathways involving hexokinases, glucose transporter-like proteins, G protein-coupled receptors and protein kinases have been well-characterized in yeast [30-33]. Studies of multicellular filamentous fungi are at only a nascent stage. However, it is clear that the situation is considerably more complex in filamentous fungi than in yeast. This could be due to the preference of yeast for glucose fermentation instead of aerobic metabolism through the Krebs cycle as is the case in filamentous fungi. Although hydrolases, sugar transport and assimilation are essential for biomass degradation, we also observed other cellular responses induced when *A. niger* was exposed to SEB. We noticed decreased mRNA accumulation in several genes involved in cell growth and morphogenesis. Because *A. niger* grows in an intermingled fashion with the set of SEB macroscopic fibers, it is not possible to accurately evaluate the dry weight of *A. niger* mycelia. We also tried to measure total protein concentration by Bradford and Biuret protein assays, but we were unable to obtain coherent results, most likely because of sugar interference (data not shown). However, it is possible

that there is a slow biomass increase during the 24-hour exposure of *A. niger* mycelia to SEB. This slow growth is reflected in the reduced mRNA accumulation of several genes crucial to cell-cycle progression and signaling. It remains to be determined how significant these signal transduction pathways are for lignocellulosic sensing. Genes involved in fermentation have also shown increased mRNA accumulation during *A. niger* growth on SEB. There is evidence in the literature indicating that some fermentation occurs in addition to respiration through the Krebs cycle in filamentous fungi [34-36], and it is possible that, during growth on SEB, *A. niger* metabolizes sugars via fermentation pathways in addition to the pentose phosphate pathway and the Krebs cycle.

A. niger *xlnR* is a transcription factor that functions as a master regulator which activates genes that encode enzymes of the xylanolytic-cellulolytic enzyme system [11]. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), DNase I footprinting, functional assays and comparisons of various xylanolytic promoters have helped to define the XlnR-binding consensus as 5'-GGCTAA-3' or 5'-GGCTAG-3' [14-16]. We were able to identify either one or both of these two motifs in several putative XlnR-binding sites in the promoters of the genes that were induced by SEB. Surprisingly, we were not able to identify them in a number of cellulase-, hemicellulase- and xylose-induced transporter genes, which suggests that there are other functional XlnR-binding motifs. Further characterization of the mRNA accumulation of these genes in the $\Delta xlnR$ mutant as well as DNA promoter binding assays (such as EMSA) will help to clarify whether these putative motifs are functional. Actually, the *A. oryzae* XlnR homologue binds to 5'-GGCTAA-3' and 5'-GGCTGA-3' [37,38] while *T. reesei* Xyr1 homologue binds to several 5'-GGC(A/T)3-3' motifs [39]. Therefore, it is possible that there are other XlnR-binding functional motifs different from those currently described. Further investigation is needed to clarify this issue.

Conclusions

We have defined which genes are transcriptionally modulated in the early steps of growth on SEB. This study represents the first time that global transcriptional analysis has been performed for an industrial fungus grown on SB. Our analysis has revealed genes that are specifically induced when pretreated SB is used as a carbon source. Degradation of SB requires the production of many different enzymes which are regulated by the type and complexity of the available substrate. It is essential to understand which genes encoding hydrolytic enzymes are induced in the presence of SB if the intent is to produce enzymatic cocktails to hydrolyze this

pretreated biomass. In addition to predicted cellulase genes, we identified genes encoding hemicellulases, carbohydrate esterases, β -glucosidases, β -xylosidases and other proteins predicted to have activity on carbohydrates in the *A. niger* transcriptome from SEB. In addition to these findings, we discovered that many genes with increased expression during growth on SEB encode proteins of unknown function and are conserved in other cellulolytic fungi. Some of these genes may encode putative proteins important for SEB saccharification, such as nonhydrolytic accessory proteins that increase or favor enzymatic efficiency. Our work opens new possibilities for the understanding of sugarcane biomass saccharification by *A. niger* hydrolases. The most important aspect of our study with regard to achieving these biotechnological goals is the comprehension of how gene expression is regulated during SEB saccharification. The heterologous expression of the genes that encode hydrolytic enzymes and their addition to enzymatic cocktails could improve enzymatic hydrolytic efficiency and consequently SEB saccharification. In addition, the construction of *A. niger* strains overexpressing some of the genes encoding these proteins can improve SEB saccharification. We observed a great number of transporter-encoding genes that may be functionally redundant or capable of transporting oligosaccharides produced by the action of secreted hydrolytic enzymes. Thus, by improving the efficiency of industrial fermentation of biomass hydrolytic products, it is possible to construct strains capable of transporting oligosaccharides by heterologous expression of *A. niger* transporters. This was recently achieved by expressing the *N. crassa* cellodextrin transport system in *S. cerevisiae* and promoting the efficient growth of this yeast strain on cellodextrins [40]. Further work involving several of the genes and pathways described herein will help to pave the way to more efficient enzymatic cocktails and second-generation bioethanol.

Methods

Strains and culture conditions

A. niger used was the N402 strain. The stock cultures were kept on silica beads with 7% milk (wt/vol) at 4°C. BCM (pH 5.5) was composed of 0.05% yeast extract (wt/vol), 50 ml/L salt solution (6 g/L NaNO₃, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L KCl and 0.5 g/L MgSO₄), 200 μ L/L trace elements (10 g/L ethylenediaminetetraacetic acid, 4.4 g/L ZnSO₄·H₂O, 1.0 g/L MnCl₂·4H₂O, 0.32 g/L CoCl₂·6H₂O, 0.315 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.22 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1.47 g/L CaCl₂·2H₂O and 1 g/L FeSO₄·H₂O) and a predetermined concentration of carbon source according to our experimental conditions. For cultivation in medium with SEB as the carbon source, the mycelia grown in the BCM were exhaustively

washed with sterile distilled water and then transferred into BCM without 0.05% yeast extract but with 0.5% wt/vol of SEB as the carbon source. The BCM, BCM without yeast extract and BCM with SEB media contained (means $\pm$ SD): 3.1380 $\pm$ 0.1018 mg/ml, 0.0036 $\pm$ 0.004 mg/ml and 0.0073 $\pm$ 0.0012 mg/ml reducing sugars, respectively (data represent means of three experiments run in triplicate, with each medium type run three times using dinitrosalicylic acid (DNS)) [41]. SEB was kindly donated by Nardini Agroindustrial Ltda, Vista Alegre do Alto, São Paulo, Brazil, and was prepared as follows. *In natura* SB was treated with 14 kg/cm² water steam for eight minutes. The SEB was exhaustively washed with deionized water until reducing sugars were not detected by DNS [41]. After being washed, the SEB was kept completely dry at 40°C for several days and stored at room temperature. SEB fragments were stained with 0.05% toluidine blue for ten minutes and washed twice with water for five minutes.

Xylan and steam-exploded sugarcane induction

A. niger spores were cultivated in complete medium (CM) at 30°C for three to five days and harvested by adding 20 ml of distilled water. The spore suspensions were inoculated to a final concentration of 1×10^6 spores per 30 ml of BCM culture. The spores were grown in BCM with 1% fructose (wt/vol) as the carbon source at 30°C for 24 hours and then transferred to either 1% xylose or 1% xylan (Sigma, St Louis, MO, USA) or 0.5% SEB (wt/vol) as the carbon source for 6, 12 or 24 hours. Mycelia were harvested by filtration through Whatman grade 1 filters (GE Healthcare, Grandview Blvd. Waukesha, WI, USA), washed thoroughly with sterile water and quickly frozen in liquid nitrogen for further RNA extraction. The supernatant was kept at -20°C for enzymatic analysis.

Determination of enzymatic activities

Xylanase (endo-1,4- β -xylanase) and cellulase (endo-1,4- β -glucanase) assays were performed using Azo-Xylan (Birchwood) and Azo-CM-Cellulose (both from Megazyme International, Bray, Ireland) as substrates, respectively, according to the manufacturer's protocols. Briefly, supernatant containing enzymes from SEB- or xylan-induced *A. niger* was mixed with 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) in an appropriate volume. Reaction mixtures consisted of 0.5 ml of buffered enzyme preparation and 0.5 ml of substrate solution (1% wt/vol Azo-Xylan (Birchwood) for xylanase assay or 1% wt/vol Azo-CM-Cellulose for cellulase assay). The samples were incubated at 40°C for ten minutes, and the reactions were interrupted by adding 2.5 ml of ethanol (95% vol/vol) with vigorous stirring. Nondegraded substrate precipitated by ethanol was removed by centrifugation

at $1,000 \times g$ for ten minutes, and the absorbance of the supernatant at 590 nm was measured. Enzymatic activity was determined using Mega-CalTM software (Megazyme International). One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 mM D-xylose-reducing sugar equivalent per minute from arabinoxylan (pH 4.5) at 40°C.

RNA extraction and real-time PCR reactions

After being harvested, mycelia were disrupted by grinding and total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). RNA (10 µg) from each treatment was fractionated in 2.2 M formaldehyde and 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized with UV light to check RNA integrity. The samples were then treated with RNase-free DNase as previously described [42], purified using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) and then quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

All the PCR reactions were performed using the ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and the TaqMan Universal PCR Master Mix kit (Applied Biosystems/Life Technologies). The reactions and calculations were performed according to the method described by Semighini *et al.* [42]. The primers, including the LUXTM fluorogenic primer (Invitrogen/Life Technologies), and probes used in this work are described in Additional file 6, Table S6, and the coefficients of the linear regression lines (standard curves) were added as described in Additional file 7, Table S7. The results of the microarray hybridizations were validated by real-time RT-PCR using an independent biological repetition different from those used for microarray hybridizations.

Microarray slides construction and gene expression methods

To construct the microarray slides, we used the Agilent Technologies eArray software tool (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>; Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA). Briefly, we uploaded 14,086 gene sequences representing the *A. niger* CBS513.88 strain gene sequences. This ORF number was carefully validated by comparing the sequences deposited in three databanks (CADRE (The Central Aspergillus Resource), JGI (Joint Genome Structure) and the BROAD Institute) with the aim of identifying and validating the sequences for probe design. Although some discrepancies in sequence length and number were detected, we were able to identify 14,086 ORFs, which were uploaded to eArray. On the basis of some quality parameter implemented in eArray (such as sequences with high scores

for cross-hybridization potential throughout the genome and sequences for which no appropriate regions could be found as targets), 14,052 probes were designed from the uploaded sequence of CBS513.88. These probes were represented three times in the microarray slides, and the annotation based on the work of Pel *et al.* [9] was used to generate the annotation file used in the analysis. Therefore, the microarray slides comprised 45,220 features representing 1,417 eArray internal controls and 600 internal controls representing 60 randomly chosen ORFs (10 replicates).

To verify differential transcriptional activation of genes in *A. niger* grown on SEB for 6, 12 and 24 hours, we measured gene expression using microarray procedures. The gene expression analysis used in this work was carried out using custom-designed oligonucleotide slides (4×44 K microarray slides; Agilent Technologies, Inc), based on publicly available *A. niger* genome annotation. After RNA isolation and purification as described above, the samples were labeled with cyanine 3 (Cy3) or Cy5 dUTP using two-color microarray-based gene expression analysis (Quick Amp Labeling Kit; Agilent Technologies, Inc) according to the manufacturer's protocol. Initially, 5 µg of total RNA were incubated with Agilent Technologies RNA Spike-In Kit control probes (Spike A or B Mix). Prior to labeling, synthesis of cDNA was carried out by incubating the samples with 1.2 µl of T7 promoter primer and nuclease-free water in an appropriate volume. The template and primer were denatured by incubating the reaction at 65°C in a circulating water bath for ten minutes, and were placed on ice for five minutes after the reactions. We added Agilent Technologies cDNA Master Mix (4 µl of 5× First-Strand Buffer, 2 µl of 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 µl of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphate mix, 1 µl of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT) and 0.5 µl of RNaseOut) to the samples, and the mixture was incubated at 40°C in a circulating water bath for two hours. Afterward the samples were moved to a 65°C circulating water bath and incubated for 15 minutes. cRNA amplification and labeling were performed by adding Agilent Technologies Transcription Master Mix (20 µl of 4× transcription buffer, 6 µl of 0.1 M DTT, 8 µl of nucleoside triphosphate mix, 6.4 µl of 50% PEG, 0.5 µl of RNaseOUT, 0.6 µl of inorganic pyrophosphatase, 0.8 µl of T7 RNA polymerase, 2.4 µl of Cy3-CTP added to control samples or Cy5-CTP added to treated samples, and 15.3 µl of nuclease-free water) to the samples and incubating the mixture in a circulating water bath at 40°C for two hours. The labeled cRNA was purified using the RNeasy Mini Kit and then quantified in the NanoDrop 2000 spectrophotometer.

For the hybridization, 825 ng of each labeled cRNA were mixed with Agilent Technologies fragmentation

buffer (11 μ l of 10 $\times$ blocking agent, 2.2 μ l of 25 $\times$ fragmentation buffer and nuclease-free water to bring the volume to 52.8 μ l) and incubated at 60°C for exactly 30 minutes to fragment RNA. The fragmentation was interrupted by adding 55 μ l of 2 $\times$ Hi-RPM GE Hybridization Buffer (Agilent Technologies, Inc). Next, 100 μ l of sample were placed onto the microarray slide, which was mounted into the Agilent Microarray Hybridization Chamber. The hybridization was carried out in a microarray hybridization oven (G2545A; Agilent Technologies, Inc) set to 65°C for 17 hours. Afterward microarray slides were washed according to the manufacturer's instructions and scanned using a GenePix 4000B Microarray Scanner (Molecular Devices, Inc, Sunnyvale, CA, USA).

Gene expression analysis

The extraction of data from TIFF image files generated by scanning microarray slides was performed using Feature Extraction version 9.5.3.1 software (Agilent Technologies, Inc) using the linear Lowess algorithm modeling method to obtain background subtracted and normalized intensity values. The dye-normalized values generated in the Feature Extraction software data files were used to upload the ExpressConverter version 2.1 file transformation tool (TM4 Microarray Software Suite; available at <http://www.tm4.org/utilities.html>), which conveniently converts the Agilent file format to MultiExperiment Viewer (MeV) file format, which is compatible with the TM4 software platform for microarray analysis. The MeV files were then uploaded into Microarray Data Analysis System (MIDAS) software (TM4 platform), where the resulting data were averaged from replicated genes on each array from two biological replicates of each treatment. The generated MeV files were analyzed using TIGR MeV software (TM4 platform, MultiExperiment Viewer (The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, at <http://jcvi.org>)), where differentially expressed genes were statistically identified using a one-class *t*-test ($P > 0.001$). Significantly different genes were those whose mean $\log_2$ expression ratios for all included samples were statistically different from 0, which indicates the absence of gene modulation. The full data set was deposited in the National Center of Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database [GEO:GSE24798] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24798>.

To calculate the FDR, we used the method based on mixture distribution described by Allison *et al.* [43]. This method was implemented using GenStat statistical software package (VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK) with the *P* values as input, and FDRs (corrected *P* values) corresponding to each *P* value were generated. This test generates a large number of

significance values, which under H_0 (initial hypothesis) have a uniform distribution and under the alternative hypothesis can be modeled as a β - or truncated γ -density. The mixture distribution statistics estimate the parameters of the mixture distribution to derive the FDR. Further information can be obtained in the GenStat for Analysis of Microarray Data guide <http://www.vsni.co.uk/downloads/genstat/release14/doc/Microarray-Guide.pdf>.

Protein secretion analysis

The 30-ml supernatant from the sample induced with SEB for 24 hours was lyophilized and resuspended in 50 μ l of distilled water. To separate secreted proteins, one-dimensional PAGE was performed using NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels (Invitrogen/Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 μ l of sample were mixed with 4 $\times$ NuPAGE LDS Sample Buffer, heated at 70°C for ten minutes and loaded onto the gel. The gel run was prepared 20 $\times$ NuPAGE MES SDS Running Buffer to 950 ml of deionized water and performed at 125 mA with 1 $\times$ SDS Running Buffer. To visualize the secreted proteins, the gel was stained with mass spectrometry-compatible Coomassie Brilliant Blue G-250 (USB Corp, Cleveland, OH, USA) and washed in 1% acetic acid before being imaged and processed for mass spectrometry.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

Peptide mass fingerprinting of selected bands was carried out by in-gel trypsin digestion (Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega, Madison, WI, USA) as reported previously [44]. Briefly, peptides were extracted from the gels using 60% acetonitrile in 0.2% trifluoroacetic acid (TFA), concentrated by vacuum drying and desalted using C18 reverse-phase microcolumns (OMIX Pipette Tips; Varian, Inc, Walnut Creek, CA, USA). Peptide elution from tip columns was performed directly into the mass spectrometer sample plate with 3 μ l of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 60% aqueous acetonitrile containing 0.2% TFA). Mass spectra were acquired using a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB SCIEX, Foster City, CA, USA) in reflector mode and externally calibrated using a mixture of peptide standards. Collision-induced dissociation MS-MS experiments of selected peptides were also performed. Proteins were identified by database searching with peptide *m/z* values using the Mascot sequence query program (Matrix Science, Inc, Boston, MA, USA) with the following search parameters: monoisotopic mass tolerance 0.05 Da, fragment mass tolerance 0.3 Da, methionine oxidation as a variable modification, and one missed tryptic cleavage allowed. Only Mowse

algorithm [45] protein scores greater than 85 were considered statistically significant ($P < 0.05$)

Additional material

Additional file 1: False discovery rate for the microarray data. Table containing statistical analysis of the microarray data based on false discovery rate (FDR). The FDR was calculated by using the method based on "mixture distribution" described by Allison et al. [43]. This method was implemented using the GenStat statistical software package (VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK) with the P values as input, and FDRs (with corrected P values) corresponding to each P value were generated.

Additional file 2: Categorization of up- and downregulated genes of *Aspergillus niger* grown on steam-exploded sugarcane bagasse. Tables showing differentially expressed (up- and downregulated) genes of *A. niger* grown on steam-exploded sugarcane bagasse (SEB) based on Functional Catalogue (FunCat) database categorization <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>. The genes were classified into different categories, which allowed us to observe the enrichment of these genes after growing *A. niger* on SEB.

Additional file 3: Time course of differentially expressed genes in *Aspergillus niger* grown on steam-exploded sugarcane bagasse. Table showing gene description and log₂ ratio of cyanine 5 to cyanine 3 (Cy5/Cy3 ratio) of differentially expressed genes (duplicates A and B) after time-course growth of *A. niger* on steam-exploded sugarcane bagasse (SEB).

Additional file 4: *In silico* identification of XlnR binding motifs. Table presenting Gene ID, the predicted *A. niger* XlnR-binding sites of genes with increased mRNA accumulation, gene function and positions of the motifs.

Additional file 5: Comparison between genes showing increased expression in *Neurospora crassa* grown on *Miscanthus* and *Aspergillus niger* grown on steam-exploded sugarcane bagasse (C compounds and carbohydrate metabolism). Table showing upregulated genes for *N. crassa* (NCU) and *A. niger* (An) grown on *Miscanthus* and steam-exploded sugarcane bagasse (SEB), respectively, as well as gene function according to FunCat gene categorization. The E -value of the categorization is provided for *A. niger* genes. For *N. crassa* E -values, please refer to Support Information Dataset 1 published by Tian et al. [23].

Additional file 6: Primers and probes used in this work. Table containing the sequences and names of primers and probes used in this work.

Additional file 7: Coefficients of the linear regression lines (standard curves) obtained using Lux probes in this work. Coefficients of the linear regression lines (standard curves) obtained by real-time RT-PCR analysis using Lux probes.

Abbreviations

bp: base pair; ha: hectare; kDa: kilodaltons; ORF: open reading frame; PEG: polyethylene glycol; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Acknowledgements

This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. We thank Dr João Atílio Jorge for helping us with the steam-exploded sugarcane bagasse and the three anonymous reviewers for their suggestions and comments.

Author details

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av do Café S/N, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ²Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de São Carlos, Brazil. ³Departamento de

Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45662-000, Ilhéus, Bahia, Brazil. ⁴Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ⁵CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalaalan 8, 3584 CT, Utrecht, The Netherlands. ⁶Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Caixa Postal 6170, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.

Authors' contributions

WRS, PFG, MS and IM performed most of the experiments. LASB performed the XlnR-binding site analysis. JCVO, MHSG and RPV performed data analysis and categorization. GHG wrote the manuscript; conceived, designed and coordinated this study; and is the principal investigator of this work. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 8 August 2011 Accepted: 18 October 2011

Published: 18 October 2011

References

1. Leite RCC, Leal MRLV, Cortez LAB, Griffin WM, Scandifoglio MIG: Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy* 2009, **34**:655-661.
2. Companhia Nacional de Abastecimento (Conab): Acompanhamento da safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, Janeiro 2011. Brasília, Brazil: Companhia Nacional de Abastecimento; 2011.
3. Goldemberg J: Ethanol for a sustainable energy future. *Science* 2007, **315**:808-810.
4. Goldemberg J: The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol Biofuels* 2008, **1**:6.
5. Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G: Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 2006, **24**:549-556.
6. Gray KA, Zhao L, Emptage M: Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol* 2006, **10**:141-146.
7. Ragauskas AJ, Williams CK, Davidson BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T: The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 2006, **311**:484-489.
8. Lin Y, Tanaka S: Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **69**:627-642.
9. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albarg R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van Dijk PW, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de Groot PW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JP, van den Hondel CA, van der Heijden RT, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJ, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmolli M, Sun J, Ussery D, Varga J, Verweijen W, van de Vondervoort PJ, Wedler H, Wösten HA, Zeng AP, van Ooyen AJ, Visser J, Stam H: Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 2007, **25**:221-231.
10. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho L, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmolli M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS: Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* 2008, **26**:553-560.
11. Stricker AR, Grossesener-Hain K, Würltner E, Mach RL: Xyl1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xyllose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell* 2006, **5**:2128-2137.
12. Ruijter GJG, Visser J: Carbon repression in *Aspergillus*. *FEMS Microbiol Lett* 1997, **151**:103-114.

13. Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, Vehmaanperä J, Penttälä M, Saloheimo M: Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:4853-4860.
14. Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW: The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:5539-5545.
15. van Peij NNME, Gielkens MMC, de Vries RP, Visser J, de Graaff LH: The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:3615-3619.
16. van Peij NNME, Visser J, de Graaf JH: Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol* 1998, **27**:131-142.
17. de Vries RP, van de Vondervoort PJ, Hendriks L, van de Belt M, Visser J: Regulation of the α -glucuronidase-encoding gene (*aguA*) from *Aspergillus niger*. *Mol Genet Genomics* 2002, **268**:96-102.
18. Andersen MR, Salazar MP, Schaap PJ, van de Vondervoort PJ, Culey D, Thykaer J, Frisvad JC, Nielsen KF, Albarg R, Albermann K, Berka RM, Braus GH, Braus-Stromeyer SA, Corrochano LM, Dai Z, van Dijk PW, Hofmann G, Lasure LL, Magnuson JK, Menke H, Meijer M, Meijer SL, Nielsen JB, Nielsen ML, van Ooyen AJ, Pel HJ, Poulsen L, Samson RA, Stam H, Tsang A, van den Brink JM, Atkins A, Aerts A, Shapiro H, Pangillan J, Salamov A, Lou Y, Lindquist E, Lucas S, Grimwood J, Grigoriev IV, Kubicek CP, Martinez D, van Peij NNME, Roubos JA, Nielsen J, Baker SE: Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* 2011, **21**:885-897.
19. Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJ, Yao J, Ward M: Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 2003, **278**:31988-31997.
20. Andersen MR, Vongsangnak W, Panagiotou G, Salazar MP, Lehmann L, Nielsen J: A trispecies *Aspergillus* microarray: comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:4387-4392.
21. Yuan XL, van der Kaaij RM, van den Hondel CA, Punt PJ, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L, Ram AF: *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel α -glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. *Mol Genet Genomics* 2008, **279**:545-561.
22. Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete E, Sándor E, Hartl L, Karafin L, Druzhinina IS, Seiboth B, Le Crom S, Kubicek CP: The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics* 2011, **12**:269.
23. Tian C, Beeson WT, Iavarone AT, Sun J, Marletta MA, Cate JH, Glass NL: Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:22157-22162.
24. van den Brink J, de Vries RP: Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **91**:1477-1492.
25. Coutinho PM, Anderson M, Kolenova K, vanKuyk PA, Benoit I, Gruben BS, Trejo-Aguilar B, Visser H, van Solingen P, Pakula T, Seiboth B, Battaglia E, Aguilar-Osorio G, de Jong JF, Ohm RA, Aguilar M, Henrissat B, Nielsen J, Stålbrand H, de Vries RP: Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fung Genet Biol* 2009, **46**:5161-5169.
26. Witteveen CFB, Busink R, van de Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Visser J: L-Arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *Microbiology* 1989, **135**:2163-2171.
27. Hasper AA, Visser J, de Graaff LH: The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol Microbiol* 2000, **36**:193-200.
28. Jojima T, Omumasaba CA, Inui M, Yukawa H: Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **85**:471-480.
29. Madhavan A, Srivastava A, Kondo A, Bisaria VS: Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biotechnol* .
30. Santangelo GM: Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:253-282.
31. Zaman S, Lippman SL, Zhao X, Broach JR: How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 2008, **42**:27-81.
32. Gancedo JM: The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2008, **32**:673-704.
33. Turcotte B, Llang XB, Robert F, Soontomgum N: Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* 2010, **10**:2-13.
34. Chambergo FS, Bonaccorsi ED, Ferreira AJ, Ramos AS, Ferreira Júnior JR, Abrahão-Neto J, Farah JP, El-Dorry H: Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem* 2002, **277**:13983-13988.
35. Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakurada R, Yamagata Y, Machida M, Akita O, Hasegawa F, Abe K, Gomi K, Nakajima T, Iguchi Y: Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, **65**:74-83.
36. Xie X, Wilkinson HH, Correa A, Lewis ZA, Bell-Pedersen D, Ebbole DJ: Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 2004, **41**:1104-1119.
37. Marui J, Kitamoto N, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N: Transcriptional activator, AoxlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Lett* 2002, **528**:279-282.
38. Marui J, Tanaka A, Mimura S, de Graaff LH, Visser J, Kitamoto N, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N: A transcriptional activator, AoxlnR, controls the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 2002, **35**:157-169.
39. Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Ota Y, Adachi M, Nakagawa S, Shimada R, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y: Identification of the cis-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Fungal Genet Biol* 2008, **45**:1094-1102.
40. Galazka JM, Tian C, Beeson WT, Martinez B, Glass NL, Cate JH: Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 2010, **330**:84-86.
41. Miller GL: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959, **31**:426-428.
42. Semighini CP, Martins M, Goldman MHS, Goldman GH: Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:1351-1357.
43. Allison DB, Gadbury GL, Heo M, Fernández JR, Lee CK, Prolla TA, Weindrich R: A mixture model approach for the analysis of microarray gene expression data. *Comput Stat Data Anal* 2002, **39**:1-20.
44. Parodi-Talice A, Durán R, Arrambide N, Prieto V, Piñeyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cerveñansky C, Robello C: Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2004, **34**:881-886.
45. Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ: Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993, **3**:327-332.

doi:10.1186/1754-6834-4-40

Cite this article as: de Souza et al.: Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* 2011 **4**:40.

Apêndice B: Artigo aceito para publicação

***Artigo:** Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production Brown, N. A; Gouvêa, P. F.; Krohn, N. G.; Savoldi, M.; Goldman, G. H.

***Artigo aceito para publicação no periódico “Biotechnology for Biofuels”**

RESEARCH

Open Access

Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production

Neil Andrew Brown¹, Paula Fagundes de Gouvea¹, Nádia Graciele Krohn¹, Marcela Savoldi¹ and Gustavo Henrique Goldman^{1,2*}

Abstract

Background: Despite recent advances in the understanding of lignocellulolytic enzyme regulation, less is known about how different carbon sources are sensed and the signaling cascades that result in the adaptation of cellular metabolism and hydrolase secretion. Therefore, the role played by non-essential protein kinases (NPK) and phosphatases (NPP) in the sensing of carbon and/or energetic status was investigated in the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

Results: Eleven NPKs and seven NPPs were identified as being involved in cellulase, and in some cases also hemicellulase, production in *A. nidulans*. The regulation of CreA-mediated carbon catabolite repression (CCR) in the parental strain was determined by fluorescence microscopy, utilising a CreA::GFP fusion protein. The sensing of phosphorylated glucose, via the RAS signalling pathway induced CreA repression, while carbon starvation resulted in derepression. Growth on cellulose represented carbon starvation and derepressing conditions. The involvement of the identified NPKs in the regulation of cellulose-induced responses and CreA derepression was assessed by genome-wide transcriptomics (GEO accession 47810). CreA::GFP localisation and the restoration of endocellulase activity via the introduction of the $\Delta creA$ mutation, was assessed in the NPK-deficient backgrounds. The absence of either the *schA* or *snfA* kinase dramatically reduced cellulose-induced transcriptional responses, including the expression of hydrolytic enzymes and transporters. The mechanism by which these two NPKs controlled gene transcription was identified, as the NPK-deficient mutants were not able to unlock CreA-mediated carbon catabolite repression under derepressing conditions, such as carbon starvation or growth on cellulose.

Conclusions: Collectively, this study identified multiple kinases and phosphatases involved in the sensing of carbon and/or energetic status, while demonstrating the overlapping, synergistic roles of *schA* and *snfA* in the regulation of CreA derepression and hydrolytic enzyme production in *A. nidulans*. The importance of a carbon starvation-induced signal for CreA derepression, permitting transcriptional activator binding, appeared paramount for hydrolase secretion.

Keywords: Carbon catabolite repression, Cellulase, Xylanase, SchA, SnfA

* Correspondence: ggoldman@usp.br

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Biotanol (CTBE), Campinas, Brazil

© 2013 Brown et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Lignocellulolytic fungi secrete a complex arsenal of enzymes that synergistically deconstruct plant cell wall polysaccharides. The capacity of these enzyme cocktails to release utilisable sugars from non-food lignocellulosic material represents an opportunity for the development of a new generation of biofuels, produced directly from plant biomass without the use of extensive pretreatment. However, efficiencies in industrial enzyme production require dramatic improvement, as the presence of readily metabolisable carbohydrates strongly impedes cellulase and hemicellulase production via carbon catabolite repression (CCR) [1,2]. Genome-wide studies have provided insights into how fungi alter transcription, metabolism and enzyme secretion in response to carbohydrate availability [3-6]. An enhanced understanding of CCR in lignocellulolytic fungi is required for the engineering and exploitation of such regulatory networks to increase enzyme secretion, reducing the costs involved in enzyme production and increasing fermentation efficiency.

In fungi, lignocellulolytic enzyme production is tightly controlled at the transcriptional level by the competitive action of transcriptional activators and repressors [7]. In *Aspergillus nidulans*, *Hypocrea jecorina* and *Neurospora crassa* the orthologous repressors CreA/Cre1 have been shown to block the transcription of genes associated with the utilisation of alternate carbon sources when glucose is present, including cellulolytic and xylanolytic enzymes [8-10]. The *A. nidulans* CreA protein has two Cys₂His₂ zinc finger DNA binding structures that demonstrate high similarity to the zinc fingers of the Mig1 repressor involved in *Saccharomyces cerevisiae* CCR [11] and has been demonstrated to be regulated at both the transcriptional and post-translational level [12].

The transcription of genes involved in alternative carbon utilisation also requires the action of transcriptional inducers. In *Aspergilli* the ethanol utilisation pathway is tightly controlled by CreA-mediated CCR and positively induced by the regulon specific transcription factor AlcR. The positive regulator, AlcR, has overlapping binding sites with CreA, suggesting a competitive binding mode of action, while nucleosomal positioning and chromatin organisation has been shown to play a role [13]. Other alternative carbon source genes adopt a similar mechanism of competitive induction including the conserved transcription factors AraR and XlnR, which positively control hemicellulase expression [14]. Interestingly, in *H. jecorina* the cellulase activator, Ace2, has been shown to bind to the same promoter motif as XlnR, while the Hap2/3 complex opens the chromatin structure, promoting nucleosome reassembly and derepression [15]. In *N. crassa* and *A. nidulans*, two newly identified transcription factors, ClrA and ClrB, have

been shown to be required for cellulase activity and expression [16].

Sensing the external environment and intracellular energetic status ensures that a fungal organism can balance the requirements for growth and cell survival. *S. cerevisiae* has served as a model organism for the study of such cellular responses. However, many differences are known to exist in filamentous fungi, due to the adoption of different life styles. Protein phosphorylation state represents the most common form of post-translational modification. Protein kinases and phosphatases perform a central role in the transduction of such signals via modulating protein phosphorylation state and activity, thus coordinating subsequent responses. The importance of protein kinases and phosphatases is demonstrated by the fact that 30% of the *S. cerevisiae* genome is modified by these proteins, while collectively kinase and phosphatase genes represent only 6% of the genome [17].

The most well studied examples included the mitogen-activated protein kinases (MAPK), which form the pheromone response, filamentous growth, the osmotic stress response and cell wall integrity pathways. The sensing of glucose or pheromones by the G-protein coupled receptors (GPCRs), results in the activation of the cAMP-protein kinase A (PKA) pathway and the MAPKs cascade, which influence filamentous growth [18]. Intracellularly, glucose is phosphorylated by hexo- and/or gluco-kinases activating Ras2 signalling that also induces the filamentous growth cAMP-PKA and MAPK pathways [19]. Apart from the well-studied roles in growth, fungal homologues of the *S. cerevisiae* pheromone response/filamentous growth MAPKs have been shown to influence the secretion of hydrolytic enzymes in various plant pathogenic fungi including *Alternaria brassicicola*, *Cochliobolus heterostrophus* and *Fusarium oxysporum* [20-22].

Homologues of the *S. cerevisiae* sensors of cellular energetic state Snf1 (sucrose non fermenting) and TOR (target of rapamycin) have been widely identified in filamentous fungi [23-28]. The Snf1 has been demonstrated to be required for growth on alternative carbon sources and also regulates the expression of 400 genes in response to carbon exhaustion [29]. The absence of the Snf1 homologue in filamentous fungi, including *Cochliobolus carbonum*, *Ustilago maydis* and *F. oxysporum*, has been shown to reduce hydrolytic enzyme production [24-26]. The essential TOR kinase complexes control cell growth and metabolism in response to environmental cues [30]. TOR has traditionally been related to nitrogen utilisation. However, TOR signalling also influences the expression of AreA-controlled genes involved in carbon metabolism [28]. Therefore TOR may perform dual roles in integrating both carbon and nitrogen signals. Different to the aforementioned kinases, the *A. nidulans* genome contains fewer phosphatases (www.

aspgd.org), suggesting that each phosphatase demonstrates less specificity and dephosphorylates multiple kinase targets. The known kinase/phosphatase signalling pathways have been proven to be highly conserved and closely interlinked, either regulating one another or the same gene sets, enabling the fine tuning of cellular responses to the extra- and intracellular environment.

Despite recent advances in the understanding of hydrolytic enzyme regulation, less is known about how different carbon sources are sensed and which signalling cascades are subsequently activated, thus coordinating the adaptation of cellular metabolism and hydrolase secretion to the respective carbon source [16,31,32]. Subsequently, this study identified 11 non-essential protein kinases (NPKs) and seven phosphatases (NPPs) involved in cellulase and in some cases also hemicellulase

production in *A. nidulans*. The involvement of the identified NPKs in starvation/cellulose-induced responses and CreA derepression was assessed by transcriptomics and fluorescence microscopy of the CreA::GFP in the parental and NPK mutant backgrounds. Collectively, this study demonstrated the overlapping, synergistic roles of the NPKs *schA* and *snfA* in the regulation of CreA derepression and hydrolytic enzyme production. In addition, a period of carbon starvation appeared paramount for CreA derepression and hydrolase induction.

Results

Screening the NPKs collection for involvement in cellulase production

Eleven of the 103 NPKs screened demonstrated a reduction in total protein content when grown in liquid

Figure 1 The AVICEL-specific reduction in growth of eleven NPKs. The dry weight of the NPKs when grown in complete media (A) and the total protein content of the NPKs when grown directly on minimal media plus AVICEL as a sole carbon source (B). One-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

minimal media (MM) supplemented with AVICEL (synthetic cellulose) as the sole carbon source for 10 days, reflecting the reduction in fungal biomass. However, the 11 NPKs did not show a significant reduction in dry weight when cultured in complete media (CM) for 48 h ($p < 0.01$) (Figure 1). The minor reduction in growth of the $\Delta pkaC$, $\Delta sakA$ and $\Delta yakA$ strains on CM was substantially less than the reduction of growth on MM plus AVICEL when compared to the parental strain. The majority of these 11 NPKs did not demonstrate a reduction in radial growth on solid CM or MM plus AVICEL, except for the $\Delta mpkA$ and $\Delta pkaC$ strains which showed extremely decreased radial growth on both solid media (data not shown). The function of these 11 NPKs was determined via homology (BLASTp) with *S. cerevisiae*, if not already characterised in *Aspergilli*, revealing NPKs involved in nutrient/cell energy status sensing and the regulation of cell growth and endocytosis (Table 1). Several of the identified NPKs are known to be involved in the cAMP signalling pathway ($pkaC$, $schA$, $ypkA$), alternative carbon source usage ($snfA$, $sakA$), starvation responses ($atmA$, $pkaA$) and endo- exo-cytosis, polarisation or morphogenesis ($cbkA$, $fpkA$, $mpkA$, $prkA$).

Subsequently, the endocellulase activity of these 11 NPKs and the transcription of two major endoglucanase genes ($eglA/B$) were determined in order to confirm that these NPKs were related to cellulase regulation and/or CCR. Both endocellulase activity and $eglA/B$ transcription were dramatically reduced in 10 of the 11 NPKs after 5 days growth in MM plus AVICEL (Figure 2). Only the $\Delta mpkA$ was shown to have similar to parental levels of endocellulase activity. The $\Delta mpkA$ strain was subsequently excluded for further analysis. The endoxylanolytic activity of the 10 NPKs grown on xylan

for 3 days, separated the NPKs into two groups (Figure 2), those which influenced both cellulase and xylanase activity including the NPKs involved in cAMP signalling ($\Delta atmA$, $\Delta cbkA$, $\Delta pkaC$, $\Delta schA$, $\Delta yakA$) and those which influenced only cellulase production including the NPKs involved in alternative carbon source usage ($\Delta pkaA$, $\Delta prkA$, $\Delta sakA$, $\Delta snfA$).

Screening of the non-essential phosphatase (NPP) collection for involvement in cellulase production

The phosphatase collection, containing 28 NPPs, was also screened for reduced growth on AVICEL as a sole carbon source. However, seven NPPs were unable to grow in MM containing glucose or AVICEL (AN0129, AN0914, AN4544, AN4896, AN5722, AN10077 and AN10138), but grew on complete media. Subsequently, it was not possible to study the role of these NPPs in relation to growth on AVICEL as a sole carbon source and hydrolase production. The NPPs that could grow on MM plus glucose were screened for reduced growth on AVICEL. Seven NPPs showed reduced growth on MM plus AVICEL, in terms of total protein, and demonstrated no significant difference in growth on MM plus 2% glucose (Figure 3). The AVICEL specific reduction in growth was correlated with a reduction in endocellulase activity and in the expression of $eglA/B$ (Figure 3).

The function of the identified NPPs, if not already characterised in *Aspergilli*, was determined via homology to *S. cerevisiae* (Table 2). Several of the NPPs identified with reduced endocellulase activity had a role in cell cycle ($ltpA$, $cdcA$, $sitA$) and MAPK regulation ($ptcA$, $ptpA$). In *S. cerevisiae* Ppg1A is required for glycogen accumulation, while also associating with Tap42 and Sit4 which are involved in TOR signalling.

Table 1 The eleven NPKs that demonstrated reduced growth on AVICEL show a conserved theme in nutrient sensing and cell growth

AspGD	<i>A. nidulans</i> gene name	Yeast best hit	Function
AN0038	<i>AtmA</i>	<i>Tel1</i>	Phospholipid metabolism, DNA damage, cell polarity, starvation
AN10485	Uncharacterised (<i>CbkA</i>)	<i>Cbk1</i>	RAM signalling, regulates cell morphogenesis
AN0144	Uncharacterised (<i>FpkA</i>)	<i>Fpk1</i>	Regulates endocytosis, sphingolipid synthesis
AN5666	<i>MpkA</i>	<i>Slr2</i>	MAP kinase, germination, polarised growth
AN6305	<i>PkaC</i>	<i>Tpk2</i>	Promotes growth in response to nutrition
AN6207	Uncharacterised (<i>PkpA</i>)	<i>Pkp1</i>	Negative regulation of pyruvate dehydrogenase
AN10515	Uncharacterised (<i>PrkA</i>)	<i>Prk1</i>	Actin filament organisation, endocytosis
AN5728	Uncharacterised (<i>SakA</i>)	<i>Sak1</i>	Upstream activator of SNF1 complex
AN4238	<i>SchA</i>	<i>Sch9</i>	cAMP signalling, role overlaps with Ras/PKA, regulated by TOR complex
AN7695	Uncharacterised (<i>SnfA</i>)	<i>Snf1</i>	Required for transcription of glucose repressed genes
AN7104	Uncharacterised (<i>YakA</i>)	<i>Yak1</i>	Inhibits growth in response to glucose, negatively regulated by Ras/PKA

Figure 2 The identified NPKs mutants demonstrated a reduction in the transcription, and capacity of, hydrolytic enzymes. The parental (WT), NPKs mutant strains were grown in MM plus 1% fructose overnight and then transferred to AVICEL or xylan as a sole carbon source for an additional 5 or 3 days, respectively. The endocellulase activity of the 5 day AVICEL culture (A). The relative expression of the major endoglucanase genes, *eglA* and *eglB*, in the mycelia isolated from the cultures used to determine endocellulase activity (B). The endoxylanase activity of the xylan cultures (C).

Protein kinase A (PKA) activity is hyperactivated upon carbon starvation and growth on AVICEL

The identification of several NPKs involved in the cAMP signalling pathway as being required for both cellulase and xylanase production resulted in an interest to investigate PKA activity in the parental strain in the presence of multiple carbon sources. Overnight 1% fructose MM cultures were transferred to alternative carbon sources for 1–8 h and PKA activity determined. No substantial difference in PKA activity was noted between various carbon sources, except for when the mycelium was transferred to AVICEL or no carbon containing media for 8 h, in which PKA activity approximately doubled (Figure 4). Only a very low, constant level of PKA

activity was observed in the $\Delta pkaC$ mutant on all carbon sources. In the absence of the ability to synthesise cAMP, assessed via utilising the adenylate cyclase $\Delta cyaA$ mutant [33], an intermediate level of PKA activity was detected in all carbon sources, demonstrating the existence of a cAMP independent route of PKA activation (Figure 4), which may occur under carbon starvation conditions, in part mimicked by the absence of cAMP.

Extracellular glucose is detected via extracellular GCPRs, while intracellular phosphorylated glucose results in RAS activation, with both routes accumulating with adenylate cyclase synthesising cAMP and PKA activation. To confirm that the conventional route of cAMP dependent PKA activation inhibited cellulase production

during growth on cellulose, the endocellulase activity of constitutively activated RAS^{G17V} strain [33] was assessed, as this would result in a constant positive signal for repression. The RAS^{G17V} strain demonstrated an approximate eight-fold reduction in endocellulase activity after 5 days growth in MM plus AVICEL (parental, 484 ± 48 U/ml; RAS^{G17V}, 60 ± 6 U/ml). This confirmed that the conventional route of PKA activation inhibits cellulase production, while suggesting that starvation induced PKA

hyperactivation performed alternative function(s) that directly or indirectly contributed to growth on cellulose.

Evaluation of CreA nuclear localisation

In order to monitor the dynamics of CCR in *A. nidulans* a CreA::GFP tagged protein under the control of the native promoter was constructed, enabling the study of CreA nuclear localisation under repression/derepression and the evaluation of the signalling components that led

Table 2 The functional description of the seven NPPs that demonstrated reduced growth on AVICEL and reduced *eglA/B* transcription

AspGD	<i>A. nidulans</i> gene name	Yeast best hit	Function
AN10570	Uncharacterised (<i>LtpA</i>)	<i>Ltp1</i>	Cell cycle
AN3793	<i>PpzA</i>	<i>Ppz1</i>	Oxidative stress resistance
AN5057	Uncharacterised (<i>cdcA</i>)	<i>Cdc14</i>	Cell cycle, mitotic exit, meiotic progression
AN6892	Uncharacterised (<i>PtcA</i>)	<i>Ptc1</i>	Type 2C protein phosphatase, inactivates osmotic stress and activates pheromone response MAPK pathways
AN6982	<i>PtpA</i>	<i>Ptp3</i>	Inactivates osmotic stress MAPK pathway
AN0164	Uncharacterised (<i>Ppg1A</i>)	<i>Ppg1</i>	Type 2A-like phosphatase, required for glycogen accumulation, associates with Tap42
AN0504	<i>SitA</i>	<i>Sit4</i>	G1/S transition of the mitotic cycle, modulates functions mediated by Pkc1p including cell wall and actin cytoskeleton organization

to CreA cellular compartmentalisation. The CreA::GFP strain constructed in the present work, demonstrated growth similar to the parental strain on various repressing and derepressing carbon sources (Additional file 1: Figure S1). The microscopic analysis of fluorescence in different carbon sources, including various simple and complex polysaccharides, non-polysaccharides and carbon starvation, assisted in the understanding of the signals involved in CreA nuclear localisation and repression.

The CreA::GFP strain was grown in glucose containing media overnight, which consistently resulted in 100% CreA nuclear localisation (Figure 5), and was then transferred to media containing an alternative carbon source. When the second medium contained a readily metabolisable mono- or di-saccharides, CreA nuclear localisation was high (Table 3). These energy sources are easily taken up and require fewer enzymatic steps prior to entering glycolysis. Within this set, glucose that is phosphorylated and enters directly into glycolysis represented

Table 3 CreA::GFP nuclear localisation post transfer between media containing different carbon sources

Strain	Start culture	Nuclear CreA	Transfer culture	Nuclear CreA
CreA::GFP	Glucose 16 h (82)	100%	Xylose 2 h (48)	68%
			Cellobiose 2 h (74)	68%
			Xylan 5 h (114)	18%
			AVICEL 5 h (74)	4%
			Glycerol 2 h (32)	31%
CreA::GFP	Glucose 16 h followed by no carbon 5 h (50)	0%	No carbon 5 h (35)	0%
			Glucose 1 h (20)	100%
			Glucose 1 h (30)	100%
			Glucose 1 h (32)	100%
			2-deoxyglucose 1 h (44)	100%
Δ <i>schA</i>	Glucose 16 h (24)	100%	6-deoxyglucose 1 h (35)	0%
			AVICEL 5 h (31)	83%
Δ <i>snfA</i>	Glucose 16 h (19)	100%	AVICEL 5 h (28)	76%
Δ <i>atmA</i>	Glucose 16 h (20)	100%	Avicel 5 h (22)	0%
Δ <i>xprG</i>	Glucose 16 h (20)	100%	Avicel 5 h (20)	0%

Fungal CreA::GFP nuclear localisation is presented as a percentage of the total number of hyphae evaluated (presented in brackets).

100% CreA nuclear localisation. Cellobiose, which requires intracellular hydrolysis into glucose, and xylose that enters glycolysis via the pentose phosphate pathway, demonstrated 68% and 70% nuclear localisation respectively. Alternative non-polysaccharide carbon sources, such as glycerol resulted in a far lower level (31%) of nuclear localisation. Complex polysaccharides, such as AVICEL or xylan, represented the lowest level of CreA nuclear localisation. Post 5 h carbon starvation, no CreA nuclear localisation was observed (Figure 5).

Growing the CreA::GFP strain overnight in glucose (100% nuclear localisation) and then exposing it to carbon starvation for 5 h (~0% nuclear localisation) enabled the study of the positive signals for CreA repression. The addition of 2-deoxyglucose which cannot be successfully metabolised, or 6-deoxyglucose that cannot be phosphorylated, to the carbon starved cultures demonstrated that the positive signal for CreA nuclear localisation required glucose phosphorylation (Table 3).

Confirmation of NPK involvement in CCR

Sexual crosses between several of the NPK mutants identified from the screening of the kinase collection with either the Δ*creA4* strain [34] or the CreA::GFP strain enabled the confirmation that *schA* and *snfA* were

required for CreA derepression and endocellulase production. The absence of *schA* and *snfA* resulted in an inability to remove CreA from the nucleus upon growth on AVICEL (Table 3). Similarly, sexual crosses between Δ*schA* or Δ*snfA* with the Δ*creA4* strain restored the endocellulase activity of these NPKs to parental levels (Additional file 2: Figure S2). However, the absence of *atmA* or the *atmA*-regulated transcription factor *xprG* did not affect CreA nuclear localisation or derepression (Table 3). Collectively, these datasets suggest that *schA* and *snfA* are required for CreA derepression thus permitting cellulase gene induction upon growth on AVICEL, while *atmA* performed additional functions that contributed to cellulase production.

Microarray analysis revealed the roles performed by *schA* and *snfA* during growth on AVICEL

In response to the transfer to AVICEL containing media for 8 h the parental, Δ*schA* and Δ*snfA* strains modulated the transcription of a similar number of genes, while after 24 h the parental strain showed a far greater transcriptional response, modulating approximately twice as many genes (Additional file 3: Table S1). FETGOat analyses were used to identify the overrepresented GO terms within the differentially expressed genes for each strain. After 8 h culture on AVICEL there was no biological process, cellular component or molecular function overrepresented in the parental strain. After 24 h culture in AVICEL containing media, the parental strain demonstrated an overrepresentation in the modulation of genes involved in aerobic respiration, carbohydrate related catabolic/metabolic processes and ribosomal biogenesis (Table 4, Additional file 4: Table S2). The overrepresentation of multiple ribosomal components was specific to the parental strain. In addition to the processes overrepresented in parental strain, the Δ*schA* strain also showed an overrepresentation of alcohol and quinone metabolic processes, plus the production of energy derived from organic compounds. No biological process, cellular component or molecular function was overrepresented in the Δ*snfA* strain after 24 h growth on AVICEL.

A comparison of the differentially up or down regulated genes in the parental and NPK mutant strains again demonstrated that the transcriptome of the parental strain was more distinct from the NPK mutant strain after 24 h culture in the presence of AVICEL (Figure 6), while of the two NPKs mutant strain, Δ*snfA* demonstrated the least similarity to the parental strain. The functional profile of the genes that were induced by 24 h growth in the presence of AVICEL was determined using MIPS functional categories and the CAZy enzyme database (Additional file 5: Table S3). This demonstrated that gene induction in response to growth on AVICEL was greatly dependent on SnfA and to a lesser extent

Table 4 The overrepresented GO terms from the FetGOat analysis ($p < 0.05$) of the genes differentially expressed within the parental and $\Delta schA$ strains post transfer from CM to MM plus AVICEL for 24 h

Parental		$\Delta schA$	
Carbohydrate catabolism / metabolism		Carbohydrate catabolism / metabolism	
GO:0016052	carbohydrate catabolism	GO:0044262	carbohydrate metabolism
GO:0030243	cellulose metabolism	GO:0005996	monosaccharide metabolism
GO:0044275	carbohydrate catabolism	GO:0005975	carbohydrate metabolism
GO:0006090	pyruvate metabolism	GO:0046364	monosaccharide biosynthesis
		GO:0016052	carbohydrate catabolism
Ribosome biogenesis and rRNA processing		Respiration and energy production	
GO:0022613	ribonucleoprotein biogenesis	GO:0046165	alcohol biosynthesis
GO:0000462	maturation of SSU-rRNA	GO:0006066	alcohol metabolism
GO:0000478	rRNA processing	GO:0045333	cellular respiration
GO:0030490	maturation of SSU-rRNA	GO:0009060	aerobic respiration
GO:0042254	ribosome biogenesis	GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds
GO:0016072	rRNA metabolism	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy
GO:0006364	rRNA processing		
GO:0000479	rRNA processing	Quinone biosynthesis	
GO:0034470	ncRNA processing	GO:0042375	quinone cofactor metabolism
GO:0042274	ribosomal subunit biogenesis	GO:0006744	ubiquinone biosynthesis
GO:0034660	ncRNA metabolism	GO:0006743	ubiquinone metabolism
		GO:0045426	quinone cofactor biosynthesis
Respiration		Cofactors biosynthesis	
GO:0009060	aerobic respiration	GO:0051188	cofactor biosynthesis
GO:0007005	mitochondrion organization	GO:0051186	cofactor metabolism
Cofactors biosynthesis			
GO:0051188	cofactor biosynthesis		
GO:0051186	cofactor metabolism		

Note that no overrepresented GO terms were identified in the $\Delta snfA$ strain. For the full lists of GO terms refer to Additional file 4: Table S2.

SchA, while SchA showed an overlapping function with SnfA (Figure 7).

The CAZy enzymes within these datasets were identified to create a profile of the hydrolytic capacity of each strain. In total, 54 glucoside hydrolases were induced by AVICEL in the parental strain, of which 31 were specifically induced in the parental strain, 8 were induced in all three strains, 14 induced in both the parental and $\Delta schA$ strains and only one was induced by both the parental and $\Delta snfA$ strains (Figure 8). Multiple hemicellulase enzymes were also induced by 24 h growth on AVICEL, despite the absence of a specific inducer in the medium. Subsequently, the expression of transcription factors known to be involved with hydrolytic enzyme production was assessed (Additional file 5: Table S3). The expression of *creA* and *araR* did not show differential regulation at either timepoint, in all the three strains. However, *xlnR* was expressed to a higher level in the

parental and $\Delta snfA$ strains after 24 h growth in the presence of AVICEL, but not in the $\Delta schA$ strain. The induction of *clrB* was substantially greater than that of *clrA* in the parental strain but this induction was absent in the $\Delta schA$ and $\Delta snfA$ strains. Additional transcription factors modulated only in the parental strain included a Gcn4p homolog (AN3675), which is involved in glyco-gen homeostasis, autophagy and starvation stress responses, positive regulators of the ethanol regulon (*alcR*) and acetate utilisation (*facB*). In both of the parental and $\Delta schA$ transcriptional responses an amino acid starvation (AN1812) and the fatty acid utilisation *farA* transcription factors were also induced.

The modulation of genes involved in transport was assessed. Different groups of transporters were either up regulated upon 24 h growth on AVICEL in all strains (14 transporters), in both the parental and the $\Delta schA$ strains (33 transporters), in both the parental and $\Delta snfA$

strains (6 transporters), or specifically in the parental strain (41 transporters). Note the low number of transporters induced in the $\Delta snfA$ strain. The far majority of the transporters induced in the parental strain lacked a defined function in *A. nidulans*. However, the functionally defined genes included transporters of amino acid, sugar, iron, calcium and sodium (Additional file 5: Table S3). The putative sugar (AN6669) and the alpha glucoside (AN3204) transporters were only up regulated in the parental strain, while an additional putative sugar transporter (AN8737) and a high affinity hexose transporter (AN6923) were induced in both the parental and $\Delta schA$ strains.

In all strains there was an induction of the *xprG* starvation response transcription factor and *hacA*, which regulates the unfolded protein response, after 24 h growth on AVICEL, suggesting the existence of starvation induced stress. Accordingly, several starvation-related genes, *atg8*, *hxcC* and the GPCR *gprH* were also up regulated. However, despite the induction of *xprG* in all strains these three starvation-response genes were not induced in the $\Delta snfA$ strain, while the *xprG*-activator kinase gene *atmA* (Krohn N, unpublished results), was repressed at a low level. Other kinase sensors of energetic status including the *sakA* and the *gal83* homolog, which are both required for Snf1 activation and nuclear

localisation in *S. cerevisiae*, were only induced in the parental strain, while the TOR kinase (AN5982) was only not induced in the $\Delta schA$ strain.

Collectively, the transcriptomic data depicts how *schA* and *snfA* are required to regulate the response to carbon limitation and growth on AVICEL. These two NPKs demonstrated a partially overlapping function in the modulation of CAZy enzyme, sugar and amino acid transporters, transcription factors and metabolism, with *snfA* appearing to be of paramount importance.

Discussion

A deep understanding of the mechanisms by which filamentous fungi sense nutrition and cellular energetic status, thus in turn regulating hydrolytic enzyme secretion is paramount for the development of efficient industrial lignocellulosic ethanol production. Protein kinases and phosphatases act as intracellular sensors and perform central roles in numerous signalling cascades that coordinate hyphal growth and metabolism in response to nutrient availability. The presented study identified the protein kinases and phosphatases required for growth on cellulose as a sole carbon source, revealing how different subsets were required for cellulase or both cellulase and hemicellulase production. A modulation of CreA derepression was subsequently identified as the

mechanism by two central NPKs, *schA* and *snfA*, controlled hydrolytic enzyme production (Figure 9).

The transcription of lignocellulolytic enzymes is tightly controlled by the competitive action of the CreA repressor and polysaccharide specific inducers. This study demonstrated that carbon starvation resulted in the loss of CreA from the nucleus and derepression, similar to the Mig1 mechanism observed in *S. cerevisiae* [35]. A previous investigation of CreA cellular localisation utilised a fusion protein under the control of a constitutive promoter and implied that intracellular localisation was not involved in the regulation of CreA-mediated repression [36]. Such an approach could overwhelm the system and may have contributed to the differences observed between the two experimental designs. Again similar to *S. cerevisiae*, the absence of the *A. nidulans* Snf1 homolog, which in *S. cerevisiae* is involved in Mig1 nuclear export and alternative carbon usage [35], resulted in a reduced ability of *A. nidulans* to utilise cellulose, transcribe hydrolytic enzymes and relocalise CreA. This appears to be in contrast to *H. jecorina* where the Snf1 homologue has been shown to phosphorylate Mig1 when expressed in *S. cerevisiae* but not the *H. jecorina* counterpart [23], while Cre1 phosphorylation in *H. jecorina* has been shown to positively

regulate DNA binding [37]. The similarity between CreA depression during growth on cellulose and carbon starvation, suggested that *A. nidulans* was experiencing starvation under both conditions. The induction of cellulases and hemicellulases when grown on cellulose as a sole carbon source, which would therefore lack a pentose metabolites and a hemicellulase inducer, has also previously been reported under carbon starvation [16] and could be the consequence of CreA derepression rather than polysaccharide specific induction. This is supported by the observation that CreA nuclear localisation was high in the presence of cellobiose, a known inducer of cellulases [38]. This concept suggests that a transient period of starvation is required from CreA derepression, thus liberating the inducer binding sites for gene induction. This is fitting with the model proposed by Delma and colleagues which observed the induction of a subset of hydrolytic enzymes under starvation conditions that were suggested to perform a scouting role [39].

In *S. cerevisiae*, the external sensing of glucose via the GPCRs-PKA pathway and the intracellular phosphorylation of glucose, which results in RAS activation, promotes Mig1-mediated CCR [19]. However, in *A. nidulans* the presence of extracellular glucose proved

Figure 8 Cellulase and hemicellulase transcription is reduced in absence of *schA* or *snfA*. The log₂ fold change in the expression of a selection of cellulases (A) and hemicellulases (B) in the parental (WT), *ΔschA* and *ΔsnfA* strains post transfer from complete media to minimal media plus AVICEL as a sole carbon source for 24 h. Gene IDs and glycoside hydrolase families are presented.

not to be essential, while glucose phosphorylation was essential, for CreA repression. As shown by the inability to recover CreA nuclear localisation after the addition of the non phosphorylatable 6-deoxyglucose to carbon starved CreA derepressed cultures, while CreA repression was recovered by the addition of the non metabolisable 2-deoxyglucose. The reduced endocellulolytic capacity of the activated RAS^{G17V} strain when grown on cellulose supported the concept that glucose phosphorylation and RAS signalling induces CreA repression. Interestingly, *pkaC* was identified as being required for growth similar to that of the parental strain on cellulose, while PKA activity was hyperactivated during growth on cellulose and carbon starvation. This suggests that the PKA performs additional starvation-induced roles, apart from CreA repression, which in *A. nidulans* that may directly, or indirectly, influence growth and survival on cellulose. During starvation, PKA activity increases in mammalian cells, promoting mitochondrial elongation, preventing autophagic degradation and maintaining ATP production, while the blocking of mitochondrial elongation precipitates in starvation-induced death [40]. In *H. jecorina*, a complex mechanism of light-dependent cellulase regulation has been shown to involve the adenylate cyclase (Acy1) and Pkac1. Schuster *et al.* [41]

demonstrated that Acy1 had a positive effect on cellulase gene expression in light and darkness, while Pkac1 only positively influenced cellulase expression in light, but negatively influenced in darkness. Thus in *A. nidulans* PKA may perform additional functions during starvation and growth on cellulose, apart from the typical GPCR/Ras-PKA pathways (Figure 9).

Several additional NPKs involved in the starvation response of multiple organisms, such as the *atnA* and *pkaA* were also identified as being required for growth on cellulose and endocellulolytic enzyme production. In mammalian cells, the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), generates NADPH and acetyl CoA from the oxidative decarboxylation of pyruvate and facilitates uptake into the mitochondria. The phosphorylation state of the PDC controls the flux through this irreversible reaction, thus directing metabolism towards the consumption of glucose in respiration or the preservation of glucose for gluconeogenesis [42]. Under starvation the pyruvate dehydrogenase kinase phosphorylates and inactivates the PDC conserving glucose and promoting fatty acid utilisation [42]. Therefore, the identification of the *pkaA* kinase suggests that a period of glucose deprivation is experienced by *A. nidulans* when grown on cellulose, which is supported by the

observed up regulation of alternative carbon source usage, such as amino acid, ethanol, acetate, fatty acid and cellulose.

The ATM kinase in mammalian cells has been identified as being involved in starvation, insulin signalling and the regulation of glucose homeostasis through the action of the p53 phosphorylation target, which in turn regulates metabolism, mitochondrial respiration and glucose transporters. In addition, a p53-independent ATM pathway has been demonstrated to activate AMPK (the mammalian SnfA homolog) via LKB1 (the mammalian homolog of SakA) via dependent and independent routes [43-45]. Low glycolytic rates and energy stress experienced by *A. nidulans* grown on cellulose could result in a similar AtmA, SakA and SnfA cascade of activation, thus regulating mitochondrial function, sugar uptake, fatty acid utilisation and hydrolytic enzyme production.

The presented study demonstrated how SnfA performed a key role in CreA derepression and the modulation of transcription, metabolism and hydrolytic enzyme secretion. In mammalian and *S. cerevisiae* cells the SnfA homologs have been shown to interact with the essential TOR kinase, which is an integrator of nutrient and growth factor inputs that control cell growth [30]. Interestingly, homologs of two phosphatases revealed in this study to be required for hydrolytic enzyme production and growth on cellulose, are involved in TOR signalling in *S. cerevisiae*.

Homologs of the SchA kinases have been shown to operate downstream of TOR [46]. The overlapping but lesser role of the SchA kinase, when compared to SnfA, in the regulation of the transcriptional response to growth on cellulose, in addition to the similar inability to relocalise CreA upon growth on cellulose, suggests that SchA may also have synergistic functions to SnfA in *A. nidulans*, possibly integrating the TOR signal. Similarly in *S. cerevisiae* and *A. nidulans*, the SchA kinase has also been shown to have synergistic and opposing functions with PKA, in the regulation of transcription [33,47].

Multiple NPKs and NPPs involved in filamentous growth, polarisation, and morphogenesis were also identified as being required for growth on cellulose and hydrolase secretion. Endo- and exo-cytosis are key processes for the sensing of, and interaction with, the environment. Such processes have been shown to regulate glucose transporters in mammalian cell [48]. Therefore, the identification of such NPKs and NPPs could represent the impact of these mutations on endo- exo-cytosis, thus influencing secretion, the distribution of transporters in the cell membrane and the import of inducer molecules.

Conclusion

An initial period of carbon starvation appears to play a role in the activation of the nutrient/energy sensing

kinase pathways and that CreA derepression is an essential prerequisite for hydrolytic enzyme induction. Through homology with more extensively studied systems, a model for how the identified kinases and phosphatases regulate hydrolytic enzyme production can be postulated. However, the genetic interactions between these kinases and phosphatases in *A. nidulans* require further study prior to the reconstruction of relevant signalling cascades. Even so, it is clear that SnfA-mediated CreA derepression and transcriptional responses, which regulate metabolism, transport and hydrolytic enzyme secretion, are paramount for growth on cellulose, while the SchA kinase appeared to have an overlapping mechanism and synergistic function with SnfA.

Methods

Strains and culture conditions

The parental *A. nidulans* TNO2a3 (*pyrG89*; *pyroA4*; *nkuA::argB*) strain was used as a reference in all experiments. The null mutant collections of 103 non-essential protein kinases (NPKs) and 28 non-essential phosphatases, created by *in vivo* recombination in *S. cerevisiae* followed by *A. nidulans* protoplast transformation (http://www.fgsc.net/Aspergillus/KO_Cassettes.htm; [49,50]) were utilised. The Δ *cyaA* and the activated RAS^{G17V} strains were provided by N. Keller, University of Wisconsin-Madison, USA [34]. The Δ CreA strain was provided by M. Flipphi, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Spain [34]. All fungal strains were propagated on complete (2% w/v glucose, 0.5% w/v yeast extract, trace elements) or minimal media (1% w/v glucose, nitrate salts, trace elements, pH 6.5) plus 2% w/v agar.

Screening for reduced growth on AVICEL

Complete media (CM) cultures (50 ml) were inoculated with 1×10^7 conidia and incubated on a rotary shaker (180 rpm) set at 37°C for 24 h. Liquid minimal media (MM) cultures containing 1% AVICEL, instead of glucose as a carbon source were prepared as with the CM cultures, but were incubated for 10 days under the same conditions. The mycelia of the CM and MM plus AVICEL cultures were filtered, frozen in liquid nitrogen and freeze dried prior to the determination of dry weight and total protein content, respectively. The fungal biomass (dry weight) within the MM plus AVICEL cultures cannot be measured directly, due to the presence of AVICEL. Therefore, total protein content was used as a relative measurement. The mycelia from the AVICEL cultures was ground in liquid nitrogen and added immediately to the protein extraction buffer (Tris base pH 7.5 25 mM, EGTA pH 7.5 15 mM, MnCl₂ 15 mM, plus a protease inhibitor cocktail (Roche)), vortexed for 5 min prior to centrifugation for 15 min at 14000 g. Protein

content was measured using the Bio-Rad protein assay according to manufacturer's instructions.

Media shift experiments and enzyme activity assays

Cultures of MM plus 1% fructose (50 ml) were inoculated with 1×10^7 conidia and incubated on a rotary shaker (180 rpm) set at 37°C for 24 h. Subsequently, the mycelia of the transfer cultures were washed with sterile water, resuspended in liquid MM plus 1% AVICEL or xylan and incubated under the same conditions for 5 or 3 days depending on the respective carbon source. The cultures were filtered and the mycelia frozen in liquid nitrogen prior to being freeze dried for RNA extraction. The culture supernatants were collected for endo-cellulase or xylanase activity assays (Megazyme) according to manufacturer's instructions.

Peptag cAMP dependant protein kinase A (PKA) activity assays

Media shift cultures were prepared as described previously. Post washing, the mycelia was transferred to a range of different carbon sources, as stated in the relevant figure and results section, for 8 h. The mycelia from the transfer cultures was collected by filtration, then frozen and ground in liquid nitrogen. Total protein was extracted as described previously and the Peptag cAMP dependent PKA activity assay (Promega) performed according to manufacturer's instructions. Quantification of the intensity of the phosphorylated substrate was determined via densitometry analysis using the ImageJ software. Results are presented as the total PKA activity per culture.

Construction of modified strains

The construction of the CreA::GFP strain was performed according to Colot *et al.* [51]. Standard molecular techniques were performed according to Sambrook and Russel [52]. The 5' untranscribed region (UTR) plus the *creA* gene (minus the stop codon), the *gfp* gene plus a spacer, the *pyrG* gene and the 3' UTR were co-transformed into *S. cerevisiae*. Homologous recombination within *S. cerevisiae* created the construct, which was subsequently amplified from pooled *S. cerevisiae* DNA, and 20 µg transformed into TNO2a3 according to Osmani *et al.*, [53]. Transformants were selected via their ability to grow on solid MM plus pyridoxine in the absence of uridine and uracil. Homologous integration was confirmed via PCR. Sexual crosses between the CreA::GFP or Δ CreA strains with the Δ *schA* and Δ *snfA* strains were confirmed by PCR, using the relevant external forward and exon reverse primers, while the absence of *atmA* was confirmed via increased camptothecin sensitivity (75 µM). The primers used are listed in Additional file 6: Table S4.

Microscopy

Strains were inoculated onto a coverslip and incubated for 12 h at 25°C in liquid MM plus various carbon sources (1% carbon w/v). During media shift experiments the coverslips were washed with MM lacking a carbon source prior to the addition of the following media and incubated at 25°C, for the duration stated in the text (dependent on carbon source). In the case of 2-deoxyglucose and 6-deoxyglucose, a final concentration 6 mM of either compound was added to 5 h carbon starved cultures and incubated for an additional hour prior to examination. Mycelia mounted on the coverslips were washed with phosphate buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4). The mycelia were then stained with 100 ng/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes) for 2 min. The mycelia were washed again in PBS and examined using a Zeiss epifluorescence microscope with excitations of 359, 498 nm and emissions 461, 516 nm for Hoechst and GFP respectively. Phase contrast bright-field and fluorescent images were captured with AxioCam camera (Carl Zeiss) and processed using the AxioVision software version 3.1.

RNA extraction and quantitative PCR

Total RNA was isolated using TRIZOL (Invitrogen), treated with DNase (Promega) and purified using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA integrity was confirmed using the Bioanalyser Nano kit (Agilent technologies) and the Agilent Bioanalyser 2100. Purified RNA was used for cDNA synthesis using Superscript III (Invitrogen) according to manufactures instructions. Quantitative PCRs were performed as previously described [54]. The Taqman fluorescent probes (Invitrogen) used for the endoglucanase genes *eglA* (AN1285) and *eglB* (AN3418) [55] are listed in Additional file 6: Table S4. Expression of the tubulin gene *tubC* (AN6838) was used as an endogenous control.

Microarray analysis

The parental, $\Delta schA$ and $\Delta snfA$ strains (1×10^7 conidia) were incubated in 50 ml CM on a rotary shaker (180 rpm) set at 37°C for 24 h. The mycelia were washed with sterile water and transferred to MM plus AVICEL for 8 and 24 h. Post incubation, the mycelia was collected by filtration and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted and integrity confirmed as described previously. The synthesis of cDNA from 200 ng of RNA and the array hybridisations were performed according to Souza et al. [56] with a minor modification to the quantity of RNA used. The RNA isolated from the CM cultures was used as the reference for the MM plus AVICEL of each strain. The dataset was deposited in the

Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE47810>).

Genes were determined as differentially expressed between the CM and MM plus AVICEL via a *t*-test ($p < 0.01$) performed within the Mev software [57]. The overrepresented GO terms within the differentially expressed gene sets from each strain were identified using the FetGOat software (<http://www.broadinstitute.org/fetgoat/index.html>). The differential regulation of gene expression between the three strains post transfer to MM plus AVICEL was determined via venn analysis and the functional profile of the gene lists determined using FunCats (http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_p130_Asp_nidul). Secreted proteins and hydrolytic enzymes were identified using TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) and the CAZy enzyme database (<http://www.cazy.org/>) respectively.

Statistical analyses

Three biological replicates were performed for all experiments and the statistical tests for significance determined via a one-tailed *t*-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), unless stated otherwise, using Prism 3.0 (GraphPad).

Additional files

Additional file 1: Figure S1. The CreA::GFP strain demonstrated a similar phenotype to the parental strain. The CreA::GFP and parental TNO2a3 strains grown on complete media or minimal media for 4 days.

Additional file 2: Figure S2. Endocellulase activity was restored when the NPKs kinase mutants were crossed with the $\Delta creA$ strain. All strains were grown in MM plus 1% fructose overnight and then transferred to AVICEL as a sole carbon source for an additional 5 days. The comparison of the endocellulase activity (U/ml) of the parental, single ΔNPK s and the $\Delta creA$ strains with the double $\Delta NPK \Delta creA$ strains is presented.

Additional file 3: Table S1. The total number of genes determined as differentially expressed (*t*-test $p < 0.01$) post transfer from CM to MM plus AVICEL for 8/24 h in the parental, $\Delta schA$ and $\Delta snfA$ strains.

Additional file 4: Table S2. The FetGOat analysis of overrepresented (Fisher's exact test, $p < 0.05$) GO terms within the list of genes differentially expressed in the parental and $\Delta schA$ strains post transfer from complete media to media containing AVICEL as a sole carbon source for 24 h. Note that no GO terms were overrepresented in the $\Delta snfA$ strain post media transfer.

Additional file 5: Table S3. The genes significantly induced (*t* test, $p < 0.01$) post transfer from complete media to minimal media containing AVICEL as the sole carbon source for 24 h in the parental, $\Delta schA$ and $\Delta snfA$ strains. Genes are presented according to whether induction occurred in a single or multiple strains. The data presented includes; MIPS functional categorisation, TargetP prediction of secretion and CAZy identification.

Additional file 6: Table S4. A list of all the primers used in the presented investigation.

Abbreviations

ATP: Adenosine triphosphate; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; CAZy: Carbohydrate active enzymes; CCR: Carbon catabolite repression; CM: Complete media; GFP: Green fluorescent protein; GO: Gene ontology; GPCR: G-protein coupled receptor; MAPK: Mitogen activated protein kinase;

MM: Minimal media; NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NPK: Non-essential protein kinase; NPP: Non-essential protein phosphatase; PKA: Protein kinase A complex; PDC: Pyruvate dehydrogenase complex; UTR: Untranscribed region.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

NAB contributed to the concept, design, acquisition and analysis of data, in addition to the preparation of the manuscript. PG, NK and MS contributed to the acquisition of data, and GHG contributed to the concept and design of the investigation in addition to the preparation of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, for providing financial support. We also thank Dr. Nancy Keller, University of Wisconsin-Madison, USA for providing the *A. nidulans* Δ creA and activated RAS^{Q79V} mutant strains, Dr. M. Filippi, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Spain, for the Δ CreA4 strain, Dr. Steve A. Osmani for providing the non-essential phosphatase (NPP) collection, and the two anonymous reviewers for their comments and suggestions. We also acknowledge the Program Project grant GM068087 (PI Jay Dunlap) for providing the non-essential kinase (NPK) collection.

Received: 27 March 2013 Accepted: 18 June 2013
 Published: 25 June 2013

References

- Ronne H: Glucose repression in Fungi. *Trends Genet* 1995, **11**:12-17.
- Ruijter G, Vissers J: Carbon repression in *Aspergillus*. *FEMS Microbiol Lett* 1997, **151**:103-114.
- Tian C, Beeson WT, Iavarone AT, Sun J, Marletta MA, Cate JHD, Glass NL: Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *PNAS* 2009, **106**:22157-22162.
- Andresen MR, Vongsangnak W, Panagiotou G, Salazar MP, Lehmann L, Nielsen J: A tri-species *Aspergillus* microarray: Comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species. *PNAS* 2008, **105**:4387-4392.
- Jorgensen TR, Goosen T, van den Hondel C, Ram A, Iversen J: Transcriptomic comparison of *Aspergillus niger* growing on two different sugars reveals coordinated regulation of the secretory pathway. *BMC Genomics* 2009, **10**:44.
- Yuan XL, van der Kaaij R, van den Hondel C, Punt PJ, van der Maarel M, Dijkhuizen L, Ram A: *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. *Mol Genet Genomics* 2008, **279**:545-561.
- Ilmén M, Salcheimo A, Onnela ML, Penttilä ME: Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:1298-1306.
- Dowzer CEA, Kelly JM: Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 1991, **11**:5701-5709.
- Mach RL, Strauss J, Zellinger S, Schindler M, Kubicek CP: Carbon catabolite repression of xyn1 (xylanase I-encoding) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol* 1996, **21**:1273-1281.
- Sun J, Glass NL: Identification of the CRE-1 Cellulolytic Regulator in *Neurospora crassa*. *PLoS One* 2011, **6**:e25654.
- Nehlin JO, Ronne H: Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J* 1990, **9**:2891-2898.
- Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP: The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol Microbiol* 1999, **32**:169-178.
- Mathieu M, Nikolaev I, Scazzocchio C, Felenbok B: Patterns of nucleosomal organisation in the alc regulon of *Aspergillus nidulans*: roles of the AlcR transcriptional activator and CreA global repressor. *Mol Microbiol* 2005, **56**:535-548.
- Battaglia E, Hansen SF, Leenderse A, Madrid S, Mulder H, Nikolaev I, de Vries RP: Regulation of pentose utilisation by AraR, but not XlnR, differs in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **91**:387-397.
- Portnoy T, Margeot A, Seidl-Seiboth V, Le Crom S, Chaabane FB, Linke R, Seiboth B, Kubicek C: Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. *Eukaryot Cell* 2011, **10**:262-271.
- Coradetti ST, Craig JP, Xiong Y, Shock T, Tain C, Glass NL: Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *PNAS* 2012, **109**:7397-7402.
- Pracek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M: Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 2005, **438**:79-84.
- Vinod PK, Sengupta N, Bhat PJ, Venkatesh KV: Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of FLO11. *PLoS One* 2008, **3**:e1663.
- Rolland F, de Winder JH, Lemaire K, Boles E, Thevelein JM, Winderickx J: Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* 2000, **38**:348-358.
- Cho Y, Cramer RA, Kim JKH, Davis J, Mitchell TK, Figuli P, Pryor BM, Lemasters E, Lawrence CB: The fus3/Kss1 MAP kinase homolog Amk1 regulates the expression of genes encoding hydrolytic enzymes in *Alternaria brassicicola*. *Fungal Genet Biol* 2007, **44**:543-553.
- Lev S, Horvitz BA: A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection. *Plant Cell* 2003, **15**:835-844.
- Di Pietro A, García-MacEira FI, Meglecz E, Roncero MI: A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* 2001, **39**:1140-1152.
- Czifersky A, Seiboth B, Kubicek CP: The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart Cre1. *Fungal Genet Biol* 2003, **40**:166-175.
- Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD: The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* 2000, **12**:237-248.
- Nadal M, García-Pedrajas MD, Gold SE: The snf1 gene of *Ustilago maydis* acts as a dual regulator of cell wall degrading enzymes. *Phytopathology* 2010, **100**:1364-1372.
- Ospina-Giraldo MD, Mullins E, Kang S: Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and Arabidopsis. *Curr Genet* 2003, **44**:49-57.
- Fitzgibbon GJ, Morozov IY, Jones MG, Caddick MX: Genetic analysis of the TOR pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2005, **4**:1595-1628.
- Teichert S, Wottawa M, Schöning B, Tudzynski B: Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism. *Eukaryot Cell* 2006, **5**:1807-1819.
- Young ET, Dombek KM, Tachibana C, Ideker T: Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* 2003, **278**:26146-26158.
- Wuilschleger S, Loewith R, Hall MN: TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 2006, **124**:471-484.
- de Vries R: Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes: relevance for industrial production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **61**:10-20.
- Kubicek C, Mikus M, Schuster A, Schmol M, Seiboth B: Metabolic engineering strategies for improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels* 2009, **2**:19.
- Chaveroche MK FS, Shimizu K, Keller N, d'Enfert C: cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2002, **44**:1001-1016.
- Shroff RA, O'Connor SM, Hynes MJ, Lockington AR, Kelly JM: Null alleles of creA, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 1997, **22**:28-38.
- Carlson M: Glucose repression in yeast. *Current Opin Microbiol* 1999, **2**:202-207.

36. Roy P, Lockington RA, Kelly JM: CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA. *Fungal Genet Biol* 2007, **45**:657–670.
37. Cziferszky A, Mach RL, Kubicek CP: Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J Biol Chem* 2002, **277**:14688–14694.
38. Znameroski EA, Coradetti ST, Roche CM, Tsai JC, Iavarone AT, Cate JH, Glass NL: Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellooligosaccharides. *PNAS* 2012, **109**:6012–6017.
39. Delmas S, Pullan ST, Gaddipati S, Kokolski M, Malla S, Blythe MJ, Ibbett R, Campbell M, Liddell S, Aboobaker A, Tucker GA, Archer D: Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *PLoS Genet* 2012, **8**:e1002875.
40. Gomes L, Di Benedetto G, Scorrano L: During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 2011, **13**:589–598.
41. Schuster A, Tisch D, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Schmoll M: Roles of protein kinase A and adenylate cyclase in light-modulated cellulase regulation in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:2168–2178.
42. Wu P, Peter JM, Harris RA: Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **287**:391–396.
43. Armata HL, Golebiowski D, Jung DJ, Ko HJ, Kim JK, Sluss HK: Requirement of the ATM/p53 tumor suppressor pathways for glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 2010, **30**:5787–5794.
44. Ditch S, Paul T: The ATM protein kinase and cellular redox signalling: beyond the DNA damage response. *Trends in Biochemical Science* 2012, **37**:15–22.
45. Shackelford DB, Shaw RJ: The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. *Nature Reviews* 2009, **9**:563–575.
46. Urban J, Souillard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R: Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 2007, **26**:663–674.
47. Roosen J, Engelen K, Marchal K, Mathys J, Griffioen G, Cameroni E, Thevelein JM, De Virgilio C, De Moor B, Winderickx J: PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* 2005, **55**:862–880.
48. Foley K, Boguslavsky S, Klip A: Endocytosis, recycling, and regulated exocytosis of glucose transporter 4. *Biochemistry* 2011, **50**:3048–3061.
49. de Souza CP, Hashmi SB, Osmani AH, Andrews P, Ringelberg CS, Dunlap JC, Osmani SA: Function analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One* 2013, **8**:e58008.
50. Son S, Osmani SA: Analysis of all protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans* identifies a new mitotic regulator, fcp1. *Eukaryot Cell* 2009, **8**:573–585.
51. Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC: A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *PNAS* 2006, **103**:10352–10357.
52. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning: Laboratory manual*. 3rd edition. NY: Cold Spring Harbor Press; 2001.
53. Osmani SA, May GS, Morris NR: Regulation of the mRNA levels of nimA, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* 1987, **104**:1495–1504.
54. Semighini CP, Marin M, Goldman MHS, Goldman GH: Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:1351–1357.
55. Lockington RA, Rodbourn L, Barnett S, Carter CJ, Kelly JM: Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2002, **37**:190–196.
56. de Souza WR, de Gouveia PF, Savoldi M, Malavazi I, Bernardes LAS, Goldman MHS, de Vries RP, de Castro Oliveira JV, Goldman GH: Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnol for Biofuels* 2011, **4**:40.
57. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Stum A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Rytsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J: TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003, **34**:374–378.

doi:10.1186/1754-6834-6-91

Cite this article as: Brown et al.: Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. *Biotechnology for Biofuels* 2013 **6**:91.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit