UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE ACTINA DE
*TRICHODERMA REESEI***

EUCLIDES MATHEUCCI JÚNIOR

SÃO PAULO

1993

"CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE ACTINA DE
TRICHODERMA REESEI"

EUCLIDES MATHEUCCI JUNIOR

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em
Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. Hamza F.A. El Dorry
IQ-USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter
ICB-USP

Prof. Dr. Hernando Antonio Del Portillo Obando
ICB-USP

SAO PAULO, SP
27 DE OUTUBRO DE 1993

Para Ana Maria e ao Bebê,

Agradecimentos

À Ana Maria pelas revisões, pelo apoio, e pela compreensão em todo o decorrer da elaboração desta dissertação, mesmo nos últimos 4 meses, apesar da fragilidade que confere a primeira gestação.

Aos meus pais, irmão e avó Jô, pelo apoio em todas as horas.

Aos pais de minha esposa, Dona Nair e Sr. Plínio, pela valiosa ajuda nas tarefas mais simples, porém que têm de serem feitas, facilitando o dia-a-dia.

Aos colegas do laboratório, Profa. Ana Lúcia, Carlão, Flávio Henrique, Jorge Alexis, Sawsan, Valéria Siéssere, Wilton Rocha Lima e Zilda Pavão pela amizade, apoio, bons e maus momentos compartilhados, enfim, por tudo.

Ao Prof. Hamza El-Dorry por oferecer um excelente laboratório e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Omar Crivellaro pelas sugestões científicas e pelas agradáveis e descontraídas conversas.

Agradeço especialmente ao Flávio Henrique Silva pela colaboração científica, especialmente na etapa final deste trabalho.

Ao Prof. Robert Ivan Schumacker pela permissão do uso do equipamento de informática de seu laboratório, bem como pelas valiosas dicas de como utilizar os programas.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação pela paciência e pela maneira séria e competente com a qual desempenham suas funções.

A Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves na qualidade de Presidente da Comissão de Pós-Graduação pelo apoio na conclusão desta dissertação.

Agradeço ao CNPq, Fapesp e PADCT pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

- **(α -P³²) dATP** - fosfato alfa³², deoxiadenosina trifosfato
- **(α -P³²) dCTP** - fosfato alfa ³². deoxicitidina trifosfato
- **(γ -P³²) dCTP** - fosfato gama ³². deoxicitidina trifosfato
- **BAP** - Fosfatase Alcalina Bovina
- **CBHI** - 1,4, β -D-Glucan Celobiohidrolase I
- ***cbhl*** - Gene que codifica para CBHI
- **DNA** - Ácido Desoxiribonucleico
- **EDTA** - Ácido Etileno Diamino Tetracético
- **EGI** - endo-1,4, β -D-Glucanase I
- ***egl*** - gene que codifica para EGI
- **pfu** - unidade formadora de placa de lise
- **SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio
- **tris** - Hidróxi Metil Amino Metano
- **u** - unidade

ÍNDICE

I- Introdução	1
I.1 - Actina	2
I.2 - <i>Trichoderma reesei</i>	5
I.3 -A Celulose	7
I.4 - Sistema Celulolítico de <i>T. reesei</i>	10
I.5 - Controle da Expressão Gênica de <i>T. reesei</i>	11
II - Objetivos	15
III - Material e Métodos	16
III.1 Soluções e Meios de Cultura	16
III.2 - Cultivo de <i>T. reesei</i>	17
III.3 - Indução e Repressão do Sistema Celulolítico	17
III.4 - Extração e Isolamento de DNA de <i>T. reesei</i>	18
III.5 - Construção da Biblioteca Genômica	19
III.5.1 - Escolha doVetor de Clonagem	19
III.5.2 - Digestão do DNA de <i>T. reesei</i>	19
III.5.3 - Ligação e Empacotamento	23
III.5.4 - Infecção de E. coli (DL538)	24
III.5.5 - Titulação do Estoque de Fagos	24
III.6 - Análise da Biblioteca Genômica e Clonagem do gene de Actina	24
III.7 - Isolamento do DNA dos Bacteriófagos	26
III.8 - Separação e Transferência do DNA	28
III.9 - Seqüenciamento do DNA	28

III.10 - Extração e Isolamento do RNA Total de <i>T. reesei</i>	29
III.11 - Separação e Transferência do RNA	30
III.12 - Marcação de Sondas de DNA	30
III.13 - Hibridização	32
IV - Resultados e Discussão	34
IV.1 - Construção Biblioteca Genômica de <i>T. reesei</i>	34
IV.2 - Análise da Biblioteca Genômica	36
IV.3 - Seqüenciamento do Gene de Actina de <i>T. reesei</i>	41
IV.4 - Características do Gene de Actina de <i>T. reesei</i>	49
IV.5 - Características da Região Promotora do Gene de Actina de <i>T. reesei</i>	55
IV.6 - Utilização do Gene de Actina Clonado	57
V -Summary	60
VI - Referências Bibliográficas	61

ÍNDICE DAS FIGURAS

<u>Figura 1</u> - Aspecto de cultura de <i>T. reesei</i>	6
<u>Figura 2</u> - Modelo de molécula de celulose	9
<u>Figura 3</u> - Modelo das moléculas de soforose e celobiose	13
<u>Figura 4</u> Esquema do bacteriófago Lambda Dash	20
<u>Figura 5</u> -Digestão do DNA de <i>T. reesei</i> com Sau 3AI	22
<u>Figura 6</u> - Fragmentos de DNA usados como inserto	22
<u>Figura 7</u> -Esquema do plasmídio pAL-41	25
<u>Figura 8</u> - Placas de lise contendo os clones recombinantes para o gene de actina	38
<u>Figura 9</u> - Comparação entre digestões do DNA dos clones recombinantes para o gene de actina	40
<u>Figura 10</u> - Esquema do plasmídio pEUC-1 e plasmídios derivados	42
<u>Figura 11</u> - Digestão do DNA do clone 4.2 e respectivos "southern blot"	44
<u>Figura 12</u> -Esquema da região correspondente ao gene de actina no clone recombinante 4.2	46
<u>Figura 13</u> - Digestão do DNA do clone recombinante 4.2 e respectivo "southern blot" a partir de onde foi construído pSal-3	47
<u>Figura 14</u> - Seqüência do gene de actina de <i>T. reesei</i>	48
<u>Figura 15</u> - Homologia do gene de actina de <i>T. reesei</i>	53
<u>Figura 16</u> - Esquema do promotor do gene de actina de <i>T. reesei</i>	56
<u>Figura 17</u> -Constitutividade do gene de actina de <i>T. reesei</i> em relação a fonte de carbono onde o fungo é crescido	58

I - Introdução

Os fungos filamentosos são importantes na medicina, indústria, agricultura e pesquisa biológica básica (54). O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é considerado como o mais eficiente produtor de celulases, sendo, portanto, um modelo para o estudo da degradação enzimática de celulose, bem como um excelente modelo para o estudo do controle da expressão gênica. As celulases constituem um sistema multienzimático induzível, o qual age sinergicamente na degradação da celulose até seu monômero básico (4); e reprimível catabolicamente por glicose. O estudo de genes constitutivos e de genes com expressão regulada em *T. reesei* traz não apenas informações importantes sobre a biologia molecular do fungo, mas também é essencial para um melhor entendimento do(s) mecanismo(s) de controle da expressão das enzimas celulolíticas. Actina é uma abundante proteína citoplasmática e principal componente do citoesqueleto de eucariotos. Neste trabalho nós descrevemos a clonagem molecular do gene de actina de *T. reesei* e sua importância para o melhor entendimento da expressão gênica deste fungo.

I.1 - Actina

Isolada por Bruno Straub em 1962, a partir de extrato de músculo de coelho (47,39), a actina vem sendo extensivamente estudada devido à sua importância em processos como a motilidade celular, em movimento amebóide, fagocitose, citocinese, extensão e retração de várias protuberâncias celulares, formação de fibras musculares juntamente com a miosina e na formação do citoesqueleto.

A actina está presente em todos os organismos eucariotos estudados, figurando como a mais abundante proteína citoplasmática. Apresentando uma similaridade em torno dos 90% dentre as diversas espécies (2), constitui uma família de proteínas altamente conservada, codificada por diferentes genes. Encontramos esta proteína em duas isoformas : actina muscular (α) e não muscular (β e γ), sendo que, aparentemente, quase todos os eucariotos possuem mais de um tipo de actina, codificadas por diferentes genes, com exceção de *S. cerevisiae*, que possui uma única seqüência codificadora para esta proteína (36). Entretanto, as isoformas de actina parecem ser, até certo ponto, intercambiáveis; por exemplo, a actina presente em musculatura de invertebrados assemelha-se à actina citoplasmática de vertebrados e não à actina muscular de vertebrados (59).

Esta proteína de 42 kd tem uma função dinâmica, podendo ter seus monômeros montados em filamentos e/ou redes, alterando assim a viscosidade da camada citoplasmática logo abaixo da membrana celular, provocando alteração da forma celular (60). A

actina cristalizada, formando complexo com DNase I (65, 18), teve sua estrutura atômica determinada por difração de raios-X até uma resolução efetiva de 2,8 Å . Os resíduos 14 a 16, localizados na extremidade amino-terminal, interagem com a miosina (50), enquanto a extremidade carboxi-terminal liga proteínas como profilina e gelsolina (33).

Já foram seqüenciados genes que codificam para actina nas mais diversas espécies, com extensões variáveis e íntrons em número e posições diferentes, dependendo da espécie e do tipo de actina (α e β) (15).

As actinas apresentam ao redor de 375 resíduos de aminoácidos, formando uma proteína que pode estar em conformações diferentes: globular (Actina G) ou polimerizada na forma de filamentos (Actina F). A actina *in vitro*, baixa temperatura, força iônica fraca e pH alcalino se apresenta na forma de monômero (actina G). Em condições fisiológicas a actina G polimeriza, processo que pode ser acelerado pela presença de ATP. *In vivo*, os microfilamentos de actina podem ser montados e desmontados, o que é influenciado por numerosas proteínas ligadoras de actina quando na presença de traços de sal (65). Foi demonstrado, ainda, que a substituição de um "cluster" de ácido aspártico (carregado negativamente), localizado na região amino-terminal, por resíduos de histidina, em um gene de actina de *D. Discoideum*, interfere apreciavelmente no Km para ligação de ATP e miosina (50).

A partir de 1980, o estudo da actina foi intensificado devido ao descobrimento de proteínas que funcionam na montagem

de estruturas utilizando a actina. Estas estruturas complexas podem ser na forma de redes, feixes de filamentos, filamentos que polimerizam em uma ou ambas as direções, sendo que estas reações são controladas por vários fatores com a fosforilação ou presença de íons (62).

Foram descritas várias proteínas com afinidade pela actina, porém algumas delas com atividade formadora de estruturas complexas: filamina (560 kd): formação de redes; vilina: formação de feixes de filamentos; gelsolina (seis domínios similares de 14 kd): participa da clivagem controlada e da montagem de estruturas de actina, sendo que este processo é controlado pela concentração de Ca^{2+} e de fosfonucleosídeos, sugerindo uma participação de mecanismos de fosforilação (33); actinina/actinogelina (204 kd): alongação do filamento, inibida por íon cálcio; sinapsina I (75 kd): liga vesículas sinápticas a microtúbulos e actina, inibida por fosforilação; spectrina (α 560 kd/ β 440 kd): filamentos em rede na região cortical de eritrócitos; etc (32).

Genes codificadores para actina em eucariotos inferiores foram estudados em vários organismos. Em *D. Discoideum*, os genes de actina formam uma família de estreitamente relacionadas, mas não idênticas seqüências. Esta família é formada por 15 a 20 genes de actina que diferem entre si em 5% a 10% de sua seqüência (62).

1.2 - *Trichoderma reesei*

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* forma filamentos tubulares multinucleados denominados hifas, que crescem por extensão apical.(figura 01).Este microorganismo é de ocorrência generalizada em solos (12).

Trichoderma reesei foi isolado na década de 40 por Mandel e Reese (26) devido à sua grande capacidade de degradar compostos celulósicos. Embora existam muitas espécies celulolíticas de *Trichoderma*, esta linhagem é peculiar, sendo-lhe atribuída a designação *Trichoderma reesei* em homenagem a Elwyn Reese, um pioneiro na caracterização do sistema celulolítico deste fungo. Os fungos do gênero *Trichoderma* têm um grande potencial de aplicação pela sua habilidade em transformar uma ampla variedade de materiais complexos de origem natural e xenobiótica (11, 17); na produção de enzimas extracelulares; no controle de doenças de plantas provocadas por outros tipos de fungos, como por exemplo o *T. harzianum* que é eficiente como agente biocontrolador contra outros fungos patogênicos de vegetais (7). Além disso, as espécies de *Trichoderma* necessitam de um mínimo de fatores nutricionais e crescem rapidamente.

As espécies de *Trichoderma* são versáteis metabolicamente, podendo utilizar, como fonte de carbono, uma grande diversidade de substratos como vários açúcares simples e polissacarídeos, como por exemplo celulose, quitina, laminarina, pectina, amido e xilano.

Figura 01 : Aspecto parcial de cultura de *Trichoderma reesei*. A) Esporo; B) Esporo Germinando; C) Hifas.

As espécies de *Trichoderma* crescem rapidamente em meio sólido ou líquido. A sua composição celular é típica dos Ascomicetos (fungos filamentosos, que crescem por extensão apical e produzem esporos), sendo rotineiramente modificada em resposta às limitações no suprimento de carbono ou nitrogênio.

As várias espécies de *Trichoderma* são excelentes produtoras de enzimas. Entre elas, as celulasas têm recebido particular atenção, visto que elas agem sobre a celulose cristalina através da ação sinérgica de três tipos principais de enzimas: celobiohidrolases, endoglucanases e celobiase (4, 51).

Através do uso de mutantes hipercelulolíticos, grandes quantidades de celulase têm sido obtidas em condições de fermentação controlada (34, 61). A alta produtividade de proteína enzimática verificada com cepas mutantes como Rut C30 está relacionada, provavelmente, com as grandes quantidades de retículo endoplásmico presentes naquele mutante.

Neste fungo, a síntese de celulase é indutível, sendo controlada pela natureza das fontes de carbono no meio de cultura. Assim sendo, celulose, celobiose e soforose (2-O-β-glicopiranosil-D-glicose) agem como indutores, enquanto que a glicose atua como repressor catabólico (4, 9, 27).

1.3 - A Celulose

Estima-se que anualmente a natureza produza, através de processo fotossintético, cerca de 4.0×10^{10} toneladas de celulose

(24). Este polissacarídeo é formado por moléculas de glicose unidas por ligação 1,4- β -glicosídicas tipo I e tipo II, sendo que as unidades repetitivas são moléculas de celobiose, e a união das celobioses adjacentes formam um polímero linear (Figura 02). A celulose está associada a outros polímeros vegetais, tais como a lignina e a hemicelulose, formando uma estrutura fibrilar bastante resistente. Tal estrutura está presente na parede celular dos vegetais e de microorganismos como a bactéria *Acetobacter xylinum* e da alga *Valonia spp* (30). Na celulose nativa, até 14.000 resíduos de β -anidroglicose estão unidos, formando um longo polímero linear com, aproximadamente, 5,15 nm de comprimento, sendo que o comprimento total de uma molécula de celulose pode atingir 5 μ m e PM de até 1,5 milhão (35).

Em preparações comerciais, a celulose se apresenta com um grau de polimerização que oscila entre 50 a 5.000 unidades de glicose. No algodão tratado, a celulose tem um grau de polimerização de 500 a 3.500 unidades de glicose por fibrila, enquanto que no papel este grau varia de 500 a 2.100 (14).

Moléculas de celulose apresentam estrutura cristalina devido a pontes de hidrogênio que se formam entre unidades hidroxila inter e intra cadeias . Nas fibrilas celulósicas aparecem regiões amorfas, devido provavelmente ao alinhamento imperfeito entre fibrilas adjacentes. Estas regiões amorfas são especialmente suscetíveis ao ataque enzimático (16).

Figura 02: Modelo de unidades celobiosil em conformação do tipo "cadeira" das unidades anidroglicose. As ligações do tipo I e II unem as unidades celobiosil formando o polímero de celulose.

I.4 - Sistema Celulolítico de *T. reesei*

O termo celulase refere-se a um grupo de enzimas que agem conjuntamente na hidrólise da celulose até glicose. Há uma ampla variedade de fungos e bactérias que são capazes de degradar a celulose cristalina (24), mas são poucos os que secretam grandes quantidades de celulase (41, 61).

A maior parte dos estudos sobre celulases foi realizada com fungos que produzem três classes de enzimas: a) celobiasas, b) endoglucanases (EG) e c) celobiohidrolases (CBH) - que agem de maneira conjunta, constituindo um sistema celulolítico capaz de hidrolisar a celulose até glicose (4).

O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* é composto por aquelas três classes de enzimas: 1,4- β -D-glucan celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) - exoglucanases - que clivam as cadeias de celulose a partir das extremidades não redutoras, resultando unidades de celobiose ou oligossacarídeos de cadeias curtas; endo-1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4) - endoglucanases - que clivam ligações β -1,4 internas das cadeias; e β -D-glucosídeo glucosidases (EC 3.2.1.21) - β -glicosidases ou celobiasas - que clivam especificamente unidades glicosídicas de celo-oligossacarídeos a partir da extremidade não redutora. Os genes que codificam para CBHI, CBHII, EGI, EGII, e β -glicosidase foram isolados e caracterizados (6, 38, 43, 52, 53, 55, 58, 13, 16). Este

sistema enzimático se caracteriza por agir sinergicamente sobre a celulose (16).

I.5 - Controle da Expressão Gênica em *T. reesei*

Quando o fungo *Trichoderma reesei* é crescido em presença de celulose, ele expressa um sistema enzimático celulolítico que é capaz de degradar a celulose até glicose. A primeira questão interessante que aparece quando se estuda a indução deste sistema por celulose é como este polímero insolúvel e incapaz de *penetrar* na célula é capaz de regular a expressão do sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*.

Foi proposto por alguns autores (27, 46) que *T. reesei* expressaria níveis constitutivos muito baixos de enzimas celulolíticas, e que a atividade destas enzimas sobre a celulose produziria um indutor solúvel que entraria na célula, induzindo a expressão do sistema celulolítico (27, 57).

Em nosso laboratório foram apresentadas evidências que sugerem fortemente que a expressão de níveis constitutivos das enzimas do sistema celulolítico estaria envolvida na expressão das celulasas (9). Utilizando-se o gene clonado da *cbhl* como sonda, foi detectado o mRNA específico da CBHI quando *Trichoderma reesei*

foi crescido em presença de celulose e não de glicose ou glicerol. Porém, quando o fungo foi crescido na presença de celulose, com a prévia adição de anticorpos específicos para cada uma das enzimas do sistema celulolítico, o mRNA não foi detectado.

A soforose (2-O- β -glucopiranosil-D-glicose) tem sido identificada como o indutor solúvel mais potente do sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* (27, 46). Este dissacarídeo, juntamente com outros, foi identificado durante o crescimento de *Trichoderma reesei* em celulose ou celobiose (27, 57), talvez como produto da atividade de transglicosilação da β -glicosidase, onde a ligação β -1,4 entre as duas glicoses que formam a celobiose é alterada para β -1,2 (figura 3). Resultados obtidos neste laboratório mostraram que a adição de anticorpos contra as celulases bloqueia a indução do sistema celulolítico por um indutor insolúvel (celulose ou avicel). Entretanto, a prévia adição de anticorpos contra as celulases não pode bloquear a indução do sistema por um indutor solúvel (a soforose), sugerindo que níveis constitutivos das celulases estão envolvidos na indução (9). Outros resultados obtidos neste laboratório (1) mostram que adicionando glicose após a indução com celulose há um rápido desaparecimento dos transcritos de CBHI e EGLI sugerindo, assim, que a glicose age como um forte repressor da expressão das celulases.

Para demonstrar que o fator limitante de indução do sistema celulolítico por celulose é o nível basal das celulases, foi verificado que a adição do sistema celulolítico exógeno resulta na

Figura 3: Estrutura molecular da **(A)**celobiose, onde a ligação entre as moléculas de glicose ocorrem entre os carbonos 1 e 4; **(B)** e da soforose, onde a ligação entre as moléculas de glicose ocorrem entre os carbonos 1 e 2.

aceleração da expressão dos transcritos de celulasas (cbhl e egl) por um indutor insolúvel, celulose, (56).

Entretanto, permanece desconhecido o exato mecanismo pelo qual a expressão destes genes é controlada.

Como ocorre a indução das enzimas celulolíticas ao nível gênico? - o primeiro e, provavelmente, o mais importante nível de controle da expressão gênica em eucariotos é o início de transcrição (19) relacionado com seqüências específicas contidas no promotor dos genes. Estes elementos cis-atuantes ("cis-acting DNA promoter elements"), geralmente localizados "upstream" ao gene a ser regulado, são responsáveis pela associação de proteínas moduladoras da transcrição, que atuam em trans ("trans-acting proteins").

Não obstante, a regulação da expressão gênica pode ser realizada ao nível pós-transcricional, principalmente com relação à estabilidade do mRNA (25).

II - Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram: a) a construção de uma biblioteca genômica do fungo *Trichoderma reesei*; b) a clonagem do gene que codifica para actina ; c) o seqüenciamento do gene de actina clonado, contendo a seqüência do gene estrutural, bem como sua região promotora, e 3' não traduzível.

A construção da biblioteca genômica do fungo é essencial para a clonagem de genes de interesse, de maneira que se possa obter também regiões flangeadoras 5'(seqüências promotoras cis atuantes) e 3' (regiões não traduzidas), as quais são importantes para o estudo da regulação gênica.

A necessidade de um gene com expressão independente da indução por celulose e da repressão catabólica por glicose tornou-se imprescindível para a continuidade de experimentos que visam comparar diferentes promotores induzíveis, sendo que o gene da actina mostrou-se apto para esta função.

Portanto, a obtenção de um gene com controle independente da fonte de carbono utilizada pelo fungo, bem como da repressão catabólica por glicose é essencial para controlar futuras análises estruturais e funcionais dos elementos envolvidos na expressão induzível e constitutiva dos transcritos das celulasas e actina em *Trichoderma reesei*.

III - Material e Métodos

III.1 - Soluções e Meios de Cultura

As seguintes soluções foram preparadas conforme Maniatis(29): 10x TBE, 20 x SSC, LB/"Top Ágar", LB/Ágar, Meio LB, Meio SM, Meio SOB, Meio SOC, Solução de Denhardt;

Ainda foram preparadas outras soluções:

Solução A: EDTA 0,1 M, NaCl 0,1 M, em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 8,0;

Solução B: EDTA 0,1 M, NaCl 0,1 M, Sarkosil 1%, em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, incubado 30 min, à temperatura de 37°C, na presença de 1 µg/ml de proteinase K;

Tampão B: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, MgCl₂, NaCl 100 mM, β-Mercaptoetanol 1 mM;

Tampão M: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl₂, NaCl 50 mM;

Estoque de Acrilamida 30%: 28,5 g de Acrilamida, 1,5g de Bis-Acrilamida, água q.s.p. 10 ml;

Gel de Acrilamida para seqüenciamento: 189g de uréia, 90 ml de TBE 5X, 90 ml de estoque de acrilamida 30%, água q.s.p. 450 ml. Deionizar com 5g de resina Bio-Rex RG 501-X8.

Meio de Crescimento de *T. reesei*: glicerol 0,08%, bacto-peptona 0,2%, (NH₄)₂SO₄ 0,14%, uréia 0,3%, CaCl₂ 0,03% e uma solução de metais (CaCl₂ 0,2%, FeSO₄.7H₂O

0,5%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,15% e ZnCl_2 0,17%, dissolvidos em HCl 28 mM) a 1%, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,0 para completar 1 l;

Meio de Manutenção do fungo PDA ("Potatoe Dextrose Agar"): Laboratórios Difco Ltda;

III.2 - Cultivo de *Trichoderma reesei*

O fungo é mantido em "slants" de PDA, à temperatura ambiente. O inóculo para culturas é preparado coletando esporos dos "slants" com água. O número de esporos desta suspensão é contado na câmara de Neubauer. São inoculados 10^8 esporos em 10 ml de meio de crescimento. Após 14 horas de cultivo à 27°C, sob agitação de 200 r.p.m., 5 ml desta suspensão são inoculados em 250 ml do meio de crescimento suplementado com 0,4 % de glicerol e crescido 20 horas, à temperatura de 27°C, sob agitação de 200 r.p.m.; quando então, o micélio é utilizado para experimentos de indução ou extração de DNA:

III.3 - Indução e Repressão do Sistema Celulolítico

A massa de fungo é centrifugada e lavada 2 vezes em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,0 e incubada no mesmo tampão por 2 h, à temperatura de 27°C, sob agitação

de 200 r.p.m. O micélio é recolhido e ressuspendido no meio de crescimento, utilizando diferentes fontes de carbono (avicel, glicerol ou glicose).

O avicel utilizado para indução foi preparado sob condições estéreis lavando-se com 1 mM de HCl, e depois lavado duas vezes com água autoclavada, e mais duas vezes com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, para então ser introduzido no meio de cultura.

A repressão catabólica por glicose foi feita adicionando-se este monossacarídeo na concentração de 30 mM à cultura de fungo que vinha crescendo com avicel.

III.4 - Extração e Isolamento de DNA de *T. reesei*

O micélio é recolhido por filtração em papel 3MM e lavado com a solução "A". A massa resultante é liofilizada e macerada em nitrogênio líquido. O pó de micélio é ressuspendido na solução B, na proporção de 10 ml para cada 1g de micélio, e incubado 1 h, à temperatura de 50°C. A suspensão foi centrifugada por 10 min, à 10.000 r.p.m., e o sobrenadante recolhido e colocado em gradiente de Cloreto de Césio, 1,3g/ml, e centrifugado por 36h à velocidade de 42.000 r.p.m., em rotor 70TI. A banda contendo DNA foi coletada com pipeta Pasteur, à qual foi adicionado um volume de água e dois volumes de etanol. Esta mistura foi incubada 2 h, à - 20°C, e então centrifugada 15 min, à 9.000 r.p.m., no rotor SS 34. O

DNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado, seco, à temperatura ambiente e ressuspendido em 250 µl de água.

III.5 - Construção da Biblioteca Genômica

III.5.1 - Escolha do Vetor de Clonagem

Utilizamos como vetor o bacteriófago Lambda DashTM II (figura 4), produzido pela Stratagene GmbH, devido às suas características: capacidade de inserção de até 23 Kb; facilidade de mapeamento, pois possui os promotores de T3 e T7 flanqueando o inserto; seleção dos recombinantes red^- gam^- em *E. coli* rec BC⁺; facilidade de manutenção, amplificação da biblioteca genômica e recuperação do inserto. Neste Kit recebemos os braços do fago (com 20 kb e 9 kb) já desfosforilados, clivados no sítio de Bam HI.

III.5.2 - Digestão do DNA de *Trichoderma reesei*

O DNA de *Trichoderma reesei* (2 µg) foi digerido com diferentes concentrações da enzima Sau 3A I, à temperatura de 37°C, por 1 h, conforme indicado abaixo:

1) 0,1 u de Sau 3A I; 2) 0,05 u; 3) 0,025 u; 4) 0,012 u; 5) 0,006 u; 6) 0,003 u;

Utilizamos como marcador de peso molecular para o exame das digestões acima DNA de lambda, com 48 kb, e DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição

Figura 04: Esquema representativo do genoma do bacteriófago Lambda Dash.

Kpn I, que produz três bandas com 31,4 Kb, 29,9 Kb e 1,5 Kb.

A partir das digestões acima descritas, selecionamos três condições (2, 3 e 4) para proceder uma digestão em larga escala (figura 5), com 10 µg de DNA de *T. reesei*, num volume final de 100 µl. O conteúdo de cada uma das reações foi extraído com fenol-clorofórmio, precipitado e ressuspendido em 100 µl de água. As suspensões de DNA, de cada digestão 2, 3 e 4, foram reunidas e o volume obtido (300 µl) dividido para aplicação em dois tubos de 10 ml cada um, contendo um gradiente de sacarose que varia entre 10% e 70% do sacarídeo. Os gradientes foram centrifugados 20 horas, à 30.000 r.p.m., no rotor SW 41 TI. Foram então coletadas 19 frações de 550 µl de cada gradiente.

Selecionamos as frações 12, 12a, 13, 13A e 14 e 14A (figura 6) do gradiente como possíveis fontes de fragmentos a serem ligados ao vetor Lambda DashTM II. Extraímos com fenol-clorofórmio e precipitamos as frações escolhidas 12, 13 e 14 e ressuspendemos em 10 µl de água.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,6%, mostrando DNA genômico de *T. reesei* parcialmente digerido com diferentes concentrações da enzima de restrição SAU 3A. Linhas 1)0,1 uni de Sau 3A I; 2)0,05 uni; 3) 0,025 uni; 4)0,012 uni; 5)0,006 uni; 6)0,003 uni;

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA de *T. reesei*, a serem utilizadas como inserto. Este DNA foi obtido por digestão parcial do genoma com a enzima de restrição SAU 3A, posteriormente submetido a ultracentrifugação em gradiente de sacarose para o isolamento de uma população de DNA de tamanho aproximado de 23 kb. As linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem respectivamente as frações 12, 12A, 13, 13A, 14 e 14A.

III.5.3 - Ligação e Empacotamento

Utilizamos como inserto os fragmentos 13 e 14, com aproximadamente 23 kb do DNA de *Trichoderma reesei* obtidos por digestão parcial com a enzima Sau 3AI. O vetor utilizado foi o fago lambda Dash, na forma do kit "Lambda DashTM II/BamH I" da empresa Stratagene. A ligação foi realizada da seguinte forma: precipitando 1µg dos braços desforilados de lambda juntamente com 1 µg da fração 13 e 1µg da fração 14 do DNA de *Trichoderma reesei*, com 0,1 volume de acetato de sódio (3M) e 2 volumes de etanol gelado (-20°C). O precipitado foi ressuspendido em 8 µl de água. A seguir, foram adicionados a estes 8 µl, 1 µl de tampão de ligase (10X), e 1 µl da enzima DNA T4 DNA ligase (2 uni). A mistura permaneceu na temperatura de 4°C durante a noite.

O empacotamento foi realizado utilizando-se um kit "Gigapack^R II Packaging Extract", da empresa Stratagene. Foram empacotados 4 µl da ligação (aproximadamente 1 µg), incubados por 2 horas, à temperatura de 22°C, e ressuspendidos em 500 µl de tampão SM. Adicionamos 20 µl de clorofórmio, agitamos e estocamos à 4°C.

III.5.4 - Infecção de *E. coli* (DL538)

As células para infecção foram preparadas conforme Maniatis (29). A infecção foi realizada em tubos de ensaio de 5 ml, onde incubamos por 20 minutos, à 37°C, 100 µl de várias diluições do estoque de fagos com 100 µl do estoque de bactérias (DO₆₀₀=2, em MgSO₄ 10 mM). Após a incubação foi despejado 3,5 ml de LB "top agar", à 47°C sobre as bactérias infectadas, as quais foram plaqueadas sobre LB ágar e crescidas durante a noite, à 37°C.

III.5.5 - Titulação do Estoque de Fagos

A titulação foi realizada infectando bactérias DL538 com diluições progressivas, a cada uma ordem de grandeza, do estoque de fagos empacotado. As placas de lise foram contadas, permitindo assim a determinação do título do estoque inicial de bacteriófagos. O título obtido para a biblioteca genômica foi de 2×10^6 pfu/µg de DNA.

III.6 - Análise da Biblioteca Genômica e Isolamento do Gene de Actina

A clonagem do gene da actina foi realizada utilizando-se como sonda uma sequência heteróloga do gene de β-actina de linfócito de camundongo, clonada no plasmídeo pAI-41 (figura 7), a partir de uma biblioteca de cDNA (22). O plasmídeo pAI-41 foi digerido com a enzima Pst I, liberando um fragmento de 1,1 kb correspondente à sequência codificadora

Figura 7: Esquema parcial do plasmídeo pAI-41, mostrando sítios de restrição da região onde foi inserido o cDNA do gene de actina de linfócito de camundongo.

para o gene de actina, que foi usado como da sonda. Este fragmento de 1,1 kb foi recuperado de gel de agarose 0,8 %, utilizando-se membrana NA 45, da Scheicher & Schuell (29). A sonda foi marcada radioativamente com P^{32} alfa-dCTP, com "Randon Primed DNA Labeling Kit" da empresa Boehringer Mannheim Biochemica, apresentando uma atividade final de $1,50 \times 10^8$ cpm/ ng de DNA. Bactérias DL538, infectadas com os fagos, foram inoculadas em 5 placas de Petri de 150 mm de diâmetro, para obtenção de 35.000 pfu/placa. Após o crescimento por 8 horas, à 37° C, as placas foram cobertas com membranas de nylon Hybond, em duplicata (29), as quais foram pré hibridizadas por duas horas, à 42°C, com a seguinte solução:

50% Formamida

6X SSC

0,05X BLOTTO (5% de leite em pó desnatado dissolvido em água contendo 0,02% de azida de sódio)

Após a pré-hibridização os filtros foram hibridizados durante a noite, a 42°C, com a mesma solução contendo 2×10^6 cpm/ml da sonda marcada.

III.7 - Isolamento de DNA dos Bacteriófagos

O crescimento do bacteriófago foi realizado infectando 5×10^8 células de *E. coli* (DL 538) em 1,5 ml de SM, com, aproximadamente, 2×10^7 pfu, por 20 minutos, à 37°C.

Esta mistura de fagos e bactérias foi inoculada em 500 ml de LB contendo 0,2% de maltose e incubada a 37°C, à 250 r.p.m. Após 10 horas, aproximadamente, observou-se uma queda acentuada na DO₆₀₀, indicando a lise das bactérias em cultura, que recebe 10 ml de clorofórmio, e continua sob agitação por mais 30 minutos (29).

Os bacteriófagos foram isolados do lisado submetendo o mesmo à ação de DNase e RNase, adicionando NaCl na concentração final de 1 M. Esta solução foi submetida à centrifugação, e os fagos contidos no sobrenadante foram precipitados pela adição de 10% de PEG 6.000 e ressuspendidos em SM, ao qual foi adicionado igual volume de clorofórmio. A fase aquosa foi recuperada e centrifugada e os fagos precipitados recolhidos em 2 ml de SM (29).

O DNA dos fagos foi isolado rompendo o capsídeo com proteinase K, na presença de 10% de SDS. A solução foi extraída com fenol-clorofórmio (1:1) duas vezes, e dialisada contra TE durante a noite. A solução contendo o DNA foi precipitada e ressuspendida em água (29).

III. 8 - Separação e Transferência do DNA

As amostras de DNA obtidas por digestão com enzimas de restrição foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 0,8%, em TBE , contendo brometo de etídio 0,5 µg/ml, sob voltagem de 15 a 20 v/cm. A transferência do DNA para filtro de nylon foi realizada utilizando o método de transferência por capilaridade. Antes da transferência, o DNA foi desnaturado emergindo-se o gel em vários volumes de NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 N por 45 minutos, neutralizado emergindo-se em vários volumes de 1,5 M NaCl e 1 M Tris-HCl, pH 7,5. A transferência foi feita com 10 X SSC, durante a noite, depois a membrana de nylon foi seca à temperatura ambiente e submetida posteriormente à 80°C por 2 horas (29).

III.9 - Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento dos subclones do clone positivo 4.2 do fago lambda foi realizado sempre com dupla fita de DNA em cubas da Bio-Rad, utilizando gel de acrilamida 6%, contendo uréia.

O método de seqüenciamento foi o de terminação de cadeia (44), sendo que para as reações de seqüência foram usados os seguintes kits: "T7 Sequencing Kit" e "Gene ATAG"

da Pharmacia LKB; e "Sequenase" da United States Biochemical(USB).

III.10 - Extração e Isolamento de RNA Total de *T. reesei*

O RNA total foi isolado por um método modificado do isotiocianato de guanidina (29). O micélio foi coletado por filtração e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O pó congelado foi ressuscitado em tampão citrato 5mM, pH 7,0, contendo isotiocianato de guanidina 4M, β -Mercaptoetanol 0,1 M e sarcosil 0,5%. Após 30 minutos em repouso, a suspensão foi centrifugada a 4.000g, à 20°C, por 15 minutos. A cada 2,5 ml do sobrenadante foi acrescentado 1g de Cscl , sendo que esta solução foi depositada sobre 1,2 ml de solução de CsCl 5,7 M em EDTA 0,1 M, pH 7,5. O conjunto foi centrifugado em rotor SW 50.1 Beckman, à 37.000 r.p.m., à 20°C, por 12 horas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e descartado, e o precipitado de RNA foi ressuscitado em 200 μ l de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 contendo EDTA 5mM e SDS a 1%. Posteriormente, o RNA foi precipitado com 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto, seguido por nova centrifugação em minicentrífuga, à 14.000 r.p.m., por 15 minutos; o precipitado foi lavado com etanol absoluto, e ressuscitado em água. A concentração do RNA foi estimada espectofotometricamente a

260 nm, assumindo que 1 unidade de D.O. corresponde à concentração de 40 µg/ml de RNA.

III.11 - Separação e Transferência do RNA

De cada amostra, 2,5 µg de RNA foram desnaturadas por incubação por 1 hora, à 50 °C, num total de 50 µl de solução contendo: 42% de glioxal, 48% de dimetilsulfóxido e 10% de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. Após incubação, adicionou-se a cada amostra 20 µl de tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 contendo 10% de Ficoll, 0,1% de azul de bromofenol. A mistura foi submetida a eletroforese, 3V/cm, em gel de agarose 1,2% em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0. O RNA foi então transferido para membrana de nylon pelo método de capilaridade, conforme descrito acima (29).

III.12 - Marcação de Sondas de DNA

As sondas utilizadas para hibridização com as amostras de DNA e RNA fixadas em membranas de nylon foram marcadas radioativamente. Quando marcamos DNA, utilizamos o kit de "Random Primer" da empresa Gibco BRL, que promove a incorporação de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP ao fragmento: o DNA a ser marcado, 25 ng dissolvido em 20 µl de água, é desnaturado em banho fervente por 5 minutos e colocado no

gelo. Ao DNA desnaturado adiciona-se: 2 μ l de dATP, 2 μ l de dGTP, 2 μ l de dTTP, todos os nucleotídeos na concentração de 0,5 mM, em 3 mM de Tris-HCl pH 7,0 e 0,2 mM de EDTA; 15 μ l da Mistura Tampão de "Random Primers", composta por 0,67 M HEPES, 0,17M Tris-HCl, 17 mM $MgCl_2$, 33 mM de β -mercaptoetanol, 1.33 mg/ml de BSA 18 OD₂₆₀ unidades/ml de "primers" oligodesoxirribonucleotídeos; 5 μ l de [$\alpha^{32}P$] dCTP, 3.000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l; e água destilada q.s.p. 59 μ l; a esta mistura de reação adiciona-se 1 μ l do fragmento Klenow (3 unidades), e incuba-se por 1 hora, à 25°C. A reação é parada pela adição de 5 μ l de 0,2 M de EDTA, pH 7,5.

Para oligonucleotídeos, a marcação foi realizada com o kit "5' DNA labeling System", da empresa Gibco BRL, que promove a incorporação de um fósforo marcado ([$\gamma^{32}P$] ATP) a extremidade 5' do fragmento de DNA. A 14 μ l (0,4 μ g) do oligonucleotídeo a ser marcado adicionam-se: 5 μ l "Forward Reaction Buffer"(5X), 300 mM Tris-HCl, pH 7,5; 25 mM KCl, 1% mM DTT, 0,1 μ M ATP, 50% (v/v) glicerol, 0,2 mg/ml BSA; 1 μ l de [$\gamma^{32}P$] ATP (10 μ Ci); e 1 μ l, 5 unidades, de polinucleotídeo quinase (PNK). Tal mistura de reação deve ser incubada por 30 minutos à 37°C. A enzima é então inativada aquecendo-se a mistura a 90°C, por 5 minutos.

Tanto o produto da reação com "random primer" quanto aquele obtido pela reação com PNK são submetidos a cromatografia em coluna de 5 ml de Sephadex G-25, eluída com água. De cada fração de 400 μ l são retirados 5 μ l colocados em tubos Eppendorf de 1,8 ml, os quais, por sua vez,

são acondicionados em frascos de cintilação. Tais frascos contendo as amostras de cada fração têm sua emissão medida (cpm) em cintilador.

III.13 - Hibridização

A membrana contendo o DNA ou RNA imobilizado é pré-hibridizada por 4 horas, à 37°C, em 5 ml (para filtros de até 150 cm²) de solução de pré-hibridização, contendo: 1 ml de Denhardt, 1,5 ml de 20X SSC, 150 µl de SDS 10%, 50 µl de Esperma de Salmão 10 mg/ml previamente desnaturado por 10 minutos em água fervente, e água para completar 5 ml.

A hibridização é realizada com a mesma solução acima descrita, adicionada da sonda adequada (1×10^6 cpm/ml).

No caso de oligonucleotídeos usados como sonda, a hibridização é feita durante a noite, à 37°C. Após a hibridização, o filtro é lavado em 6X SSC, à 4°C, por 2 minutos, duas vezes; é então lavado duas vezes por 30 minutos, à 4°C, em 6X SSC. Os filtros são lavados com uma solução de cloreto de tetrametilamônio: 5M de cloreto de tetrametilamônio 300 ml; 1M de Tris-HCl, pH 8,0, 25 ml; 0,5 M de EDTA, 2 ml; SDS 10%, 5 ml; água, 168 ml. O filtro é colocado em 50 ml da solução de cloreto de tetrametilamônio, e incubado à 50°C, por 20 minutos.

Após a incubação a membrana tem o excesso de líquido removido e é submetida à exposição a filme de raios-X.

No caso de hibridização de oligonucleotídeos, a pré-hibridização é realizada à 55°C. A hibridização é feita durante a noite, à temperatura de 65°C, e a lavagem é realizada com 2X SSC e 0,1 % de SDS por duas vezes durante 30 minutos à 50°C, quando a membrana esta pronta para exposição.

Quando da hibridização das membranas para análise da biblioteca genômica, pré hibridizamos as mesmas por duas horas, à 42°C, com a seguinte solução:

50% de Formamida

6X SSC

0,05X BLOTTO (5% de leite em pó dissolvido em água, contendo 0,02% de azida de sódio).

A hibridização foi realizada a 42°C, na mesma solução contendo 1×10^6 cpm/ml.

IV - Resultados e Discussão

IV.1 - Construção da Biblioteca Genômica de *T. reesei*

Para a construção de uma biblioteca genômica devemos selecionar, inicialmente, o tamanho dos fragmentos a serem clonados, e o vetor apropriado para a finalidade desejada.

Decidimos utilizar fragmentos de 23 kb, pois isto facilitaria a análise da biblioteca. A determinação da quantidade de pfus a serem analisadas para obtenção, com 99% de probabilidade, de uma cópia de um gene é dada pela seguinte equação:.

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-x/y)}, \text{ onde:}$$

x= 23 kb (tamanho do inserto)

p= 0,99 (probabilidade de 99%)

y= 1,5 X 10⁷ (tamanho do genoma de *Trichoderma reesei*)

N= Número de pfu a serem analisadas.

Com os dados acima, o valor de N é igual a 3.500. Portanto, a análise de 3.500 pfu é suficiente para o isolamento de um determinado gene.

A enzima utilizada para obtenção dos fragmentos a serem clonados foi Sau 3AI ('GATC), a qual possui a probabilidade de reconhecer sítios de restrição a cada 256 nucleotídeos numa sequência de nucleotídeos qualquer. Portanto, uma digestão parcial com Sau3AI produz fragmentos aleatórios representativos de todos os genes do genoma a ser analisado. O DNA genômico do fungo foi

digerido parcialmente por diferentes concentrações da enzima Sau 3AI ('GATC), conforme descrito em material e métodos (III.5.2), a qual tem extremidades compatíveis para ligação , com fragmentos cortados com Bam HI (G'GATCC), pois este sítio de restrição esta presente no sítio de múltiplas clonagens do fago Lambda Dash™.

A figura 5 mostra o perfil eletroforético da digestão do DNA de *Trichoderma reesei* com diferentes concentrações de Sau3AI. Tal análise mostra que as concentrações de enzima entre 0,1 e 0,025 u/μl (linhas 2, 3 e 4) são as mais adequadas para obtenção de fragmentos do tamanho desejado. A partir da digestão de 10 μg de DNA nas condições 2,3 e 4, após a separação em gradiente de sacarose, obtivemos as frações 12, 13 e 14, com tamanhos aproximados de 23 kb. A figura 6 mostra o perfil eletroforético destas frações.

A ligação e o empacotamento foram realizados com os kits "Lambda Dash™ II/BamHI" e "Gigapack® II Packaging Extract", respectivamente, ambos da Stratagene.

Para a titulação da biblioteca genômica infectamos *E. coli* cepa DL 538 (64), a qual permite o crescimento somente dos fagos recombinantes (red⁻ gam⁻). Foi obtido um título de 2×10^6 pfu/ml.

IV.2 - Análise da Biblioteca Genômica

Bactérias infectadas com fagos foram plaqueadas em 5 placas de Petri, de 150 mm de diâmetro, para obtenção de, aproximadamente, 35.000 pfu/placa. Após 8 horas de crescimento, a 37°C, pudemos observar placas de lise não confluentes, e de dimensões adequadas para transferência em membranas de nylon Hybond em duplicata.

Após a transferência das colônias lisadas das placas para membranas de nylon em duplicata, as mesmas são submetidas ao seguinte tratamento: SDS 10% por 5 minutos; desnaturadas em 1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH, por 5 minutos; neutralizadas em 1,5 M NaCl, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4; colocadas em 2 X SSC por 5 minutos. É importante que as membranas sejam apenas umedecidas nas soluções acima. A fixação do DNA aos filtros é feita incubando os mesmos a 80°C por 2 horas.

A hibridização com o fragmento de 1,1 kb, da sonda heteróloga de actina, derivada do plasmídio pAl-41, revelou a

presença de 8 clones recombinantes positivos, dos quais 4 foram recuperados em SM, e utilizados para a preparação de novas placas.

Das quatro placas preparadas identificamos, por hibridização com a sonda heteróloga marcada, os seguintes clones recombinantes positivos (figura 8):

- Placa 1: 5 clones numerados de 1.1 a 1.5;
- Placa 2: 8 clones numerados de 2.1 a 2.8;
- Placa 3: 8 clones numerados de 3.1 a 3.8;
- Placa 4: 14 clones numerados de 4.1 a 4.14

Dos 35 fagos recombinantes positivos apresentados, foram isolados, amplificados e tiveram seu DNA extraído, os clones 2.1, 2.3, 3.1, 3.1, 4.2, 4.3 e 4.14.

Figura 8: Autorradiografia das placas de lise hibridizadas com a sonda heteróloga pAI-41, segundo "screening".

O DNA de cada um dos sete clones recombinantes acima mencionados foi digerido por 2 horas, a 37°C, com as seguintes enzimas, em tampão comercial adequado: Eco RI, Sal I e XbaI. Estas digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% . O gel foi então transferido para membrana de nylon e hibridizado com o fragmento de 1.1 kb (entre os sítios de Pst I de pAI-41) da sonda de actina (figura 9A).

Posteriormente, a membrana da figura 9A foi fervida em água por 15 minutos, para a retirada da sonda marcada, pré-hibridizada e hibridizada novamente com um fragmento de 0,2 kb da região 5'codificadora da sequência heteróloga de actina , resultante da digestão de pAI-41 com as enzimas de restrição Pst I e Bgl II (figura 9B). Este "southern blot" revelou os segmentos do DNA dos fagos recombinantes que contêm a região 5'codificadora do gene de actina do fungo.

Uma análise das figuras 9A e 9B demonstra que os clones 3.1, 4.1, e 4.2 possuem o mesmo padrão de digestão, devendo, portanto, ser portadores do mesmo inserto. O clone 2.3, aparentemente, resistiu à digestão, provavelmente devido a contaminação, com fenol ou outro reagente durante o isolamento de seu DNA; os clones 2.1, 4.3 e 4.14 apresentaram padrões de restrição diferentes, o que pode ser devido a inserção de diferentes fragmentos do gene de actina de *Trichoderma reesei*.

Figura 9: Autorradiografia de "Southern Blots" do DNA de bacteriófagos recombinantes contendo o gene de actina de *T. reesei*. O DNA de cada um dos clones foi digerido totalmente por Eco RI (1, 4, 7, 10, 13, 16 e 19), Sal I (2, 5, 9, 11, 14, 17 e 20) e Xba I (3, 6, 8, 12, 15, 18 e 21), onde: 1, 2 e 3 correspondem ao clone 2.1; 4, 5 e 6 clone 2.3; 7, 8 e 9 clone 3.1; 10, 11 e 12 clone 4.1; 13, 14 e 15 clone 4.2; 16, 17 e 18 clone 4.3; 19, 20 e 21 clone 4.14. A) A hibridização foi realizada com um fragmento do plasmídio pAl-41 de 1.1 kb (entre os sítios de Pst I de pAl-41); B) A hibridização foi realizada com fragmento de 0,2 kb da região 5'codificadora da sequência heteróloga de actina, resultante da digestão de pAl-41 com as enzimas de restrição Pst I e Bgl II.

IV.3 - Seqüenciamento do Gene de Actina de *T. reesei*

Todos os fragmentos de DNA sequenciados foram derivados do clone 4.2. Os segmentos submetidos ao *seqüenciamento* eram inseridos no sítio de múltiplas clonagens do vetor Bluescript, da empresa Stratagene.

Primeiramente subclonamos em Bluescript um segmento de 1,2kb, originado da digestão do clone 4.2 por Sal I, numa construção denominada pEUC-1. Este fragmento hibridiza com a região 5' da sonda heteróloga de actina.

O seqüenciamento de pEUC-1 com "universal primer" e "reverse primer" resolveu 253 bases da extremidade 3' e 310 bases na extremidade 5' do inserto, respectivamente.

pEUC-1 foi mapeado por seu padrão de restrição com várias enzimas, e a partir destas informações foram produzidos os seguintes subclones em bluescript, derivados de pEUC-1 (figura 10):

- pEUC-NA1: 350 pb, entre os sítios de Nco I e Apa I.
- pEUC-BA1: 550 pb, entre os sítios de Bgl II e Apa I.
- pEUC-BB1: 600 pb, entre os sítios de Bgl II e Bam HI.
- pEUC-BB2: 600 pb

Figura 10: Esquematização do plasmídio pEUC-1, onde as setas representam as regiões seqüenciadas do próprio pEUC-1 e a partir de plasmídios derivados. As linhas denominadas p5 e p3, localizadas nas extremidades 5'e 3' respectivamente, representam a região a partir da qual foram construídos os oligonucleotídeos p3 e p5.

Os fragmentos denominados pEUC-NA1 e pEUC-BA1 foram tratados com T4 DNA Polimerase para tornar suas extremidades "blunt end" (21), e ligados ao sítio de Eco RV de bluescript. O fragmento pEUC-BB1 foi ligado ao sítio de Bam HI de bluescript.

O seqüenciamento destes subclones caracterizou 80% da sequência de pEUC-1.

Análise de homologia da seqüência obtida com vários bancos de dados, através do programa BLAST (3), revelou que o inserto de 1,2 kb contido em pEUC-1 tratava-se de uma região interna do gene de actina de *Trichoderma reesei*.

A escolha de outro fragmento que contivesse a sequência completa do gene pesquisado foi realizada a partir de 2 "southern blot" de DNA do clone 4.2 digerido com 18 enzimas de restrição presentes no sítio de múltiplas clonagens do bluescript (figura 11A); o primeiro "southern" foi hibridizado com um oligonucleotídeo p5, complementar a extremidade 5' do inserto de pEUC-1 (figura 11B); o segundo "southern" foi hibridizado com outro oligonucleotídeo p3, complementar a extremidade 3' do inserto de pEUC-1 (Figura 11C).

A partir da análise da figura 9, decidimos isolar e subclonar em bluescript um fragmento de 1,9kb, derivado da digestão do clone 4.2 com KpnI, numa construção denominada pKPN-1,9. O seqüenciamento de pKPN-1,9 foi realizado com os dois "primers" ("universal primer" e "reverse primer"), constatando-se que tal inserto continha toda a região 5' do gene incluindo 380 bases "upstream" ao início da sequência codificadora.

A **B** **C**

Figura 11: O DNA do bacteriófago recombinante 4.2 foi digerido com diferentes enzimas de restrição : 1) Apa I; 2) Bam HI; 3) Bgl II; 4) Cla I; 5) Dra II; 6) Eco RI; 7) Eco RV; 8) Hind III; 9) Kpn I; 10) Nco I, 11) Not I; 12) Pst I; 13) Sma I; 14) Sac I; 15) Sac II; 16) Sal I; 17) Xba I e 18) Xho I. A) Gel de agarose 0,8% onde foram submetidos a eletroforese as diferentes digestões. B) Autorradiografia de "Southern Blot", feito a partir do gel "A", hibridizado com o oligonucleotídeo p5, de 21 mer. C) Autorradiografia de "Southern Blot", feito a partir do gel A, hibridizado com o oligonucleotídeo p3, de 21 mer.

Entretanto, tal segmento de 1,9kb, possuía somente parte da região 3' (figura 12).

Para resolver a região 3' do gene, produzimos um "southern blot" com DNA do clone 4.2 digerido com Bgl II, Dra II, Kpn I, Pst I e Sal I (figura 13), o qual foi hibridizado com um oligonucleotídeo de 21 mer, construído a partir de uma sequência heteróloga de *Thermomyces lanuginosus*, o qual é complementar a uma região "downstream" ao sítio de Kpn I presente 158 bases antes do sinal de término de transcrição. Esta estratégia permitiu o isolamento de uma banda de 0,8kb resultante da digestão do clone 4.2 com Sal I.

O fragmento de 0,8 kb acima descrito foi subclonado em bluescript, numa construção chamada de pSAL-3' , a qual foi parcialmente seqüenciada resolvendo o restante da sequência codificadora do gene de actina de *Trichoderma reesei* (figura 14)

Figura 12: Representação da região do inserto do bacteriófago Lambda Dash que contém o gene de actina (box). As linhas abaixo do inserto representam os plasmídios pEUC-1, pKPN-1,9 e pSAL-0,8 utilizados como base para o *seqüenciamento* completo do gene de actina de *T. reesei*.

Figura 13 O DNA do bacteriófago recombinante 4.2 foi digerido com diferentes enzimas de restrição: 1) Bgl II; 2) Dra II; 3) Kpn I; 4) Pst I; e 5) Sal I. A) As digestões acima foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%. B) Autorradiografia de "Southern Blot" feito a partir do gel "A", hibridizado com oligonucleotídeo (21 mer) que corresponde à sequência "upstream" ao sítio de Kpn I, na região 3' do gene homólogo de *Thermomyces lanuginosus*.

3AT ACA GAT GAG ACA ACG AGC TAC TAC TG

B

Figura 14: Seqüência do gene de actina de *T. reesei*. A) Os códons são representados com letras maiúsculas em grupos de três, os introns por letras minúsculas. Sobre cada um dos codons esta a abreviatura do aminoácido codificado. B) Esquema representativo da seqüência, onde as linhas grossas e finas representam, respectivamente, os éxons e os íntrons, estes últimos numerados de I até V.

IV.4 - Características do Gene de Actina de *Trichoderma reesei*

O seqüenciamento de 2146 pb do clone 4.1 permitiu a identificação do gene de actina de *Trichoderma reesei*, o qual apresentou 6 exons e 5 introns de acordo com a tabela 1 abaixo:

	Início na posição	Término na posição	número de bases	número de aminoácido s
exon 1	381	390	9	3
exon 2	526	556	30	10
exon 3	753	807	54	18
exon 4	935	962	27	9
exon 5	1021	1795	774	258
exon 6	1874	2105	231	77
Total	-	-	1125	377

A verificação da posição dos exons foi realizada por comparação do gene seqüenciado com seqüências obtidas junto ao Gene Bank, de genes de actina de *Emericella nidulans*, *Thermomyces laniginosus* e *Sacharomyces cerevisiae*, os quais possuem grande identidade na seqüência de aminoácidos (até 100% em determinadas regiões), entretanto com introns de tamanhos e seqüências diferentes pouco homólogas.

Pesquisa de homologia da região seqüenciada do gene de actina foi realizada utilizando o serviço BLAST (3), no NCBI (National Center for Biotechnology Information), através do sistema Telnet. Tal pesquisa revelou que a seqüência enviada possui grande homologia (>85%) com genes dos mais diversos organismos, desde

várias espécies de fungos (*S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *E. nidulans*, *T. lanuginosus*, etc.), até insetos (*Bombix mori*, *D. melanogaster*, etc), mamíferos, peixes, aves etc. É interessante notar que esta homologia ocorre com diferentes tipos de actina, por exemplo: beta-actina citoplasmática de galinha (código EMBL: CHKACB); gama actina muscular de *O. cuniculus* (EMBL: RABRNAGNMA); alfa actina de musculo liso de *O. cuniculus* (EMBL: RABRNAASMA). Isto acontece porque a actina é uma proteína dinâmica, que pode ter seus monômeros montados em diferentes tipos de estruturas.

Devemos mencionar que não foi realizado o seqüenciamento do cDNA do gene clonado, assim, podem haver divergências da seqüência de aminoácidos proposta com aquela existente no organismo. Vários motivos nos levaram a crer que a estrutura primária proposta para a proteína actina de *Trichoderma reesei* corresponde a estrutura real, entre os quais:

- a) A identificação de seqüências consenso para a formação de estrutura em laço ("lariat structure") em cada um dos introns;
- b) As actinas, sejam musculares ou citoplasmáticas, exibem uma série de resíduos ácidos variáveis em sua extremidade N-terminal (39). Tanto em *Trichoderma reesei*, quanto em *S. cerevisiae*, dentre os primeiros 25 resíduos, 24% deles tem caráter ácido;

c) O filamento de actina apresenta uma estrutura em hélice de dupla fita, onde uma interação entre o resíduo de cisteína 374 com o resíduo de lisina 191 da subunidade vizinha, parece ser importante para a correta orientação deste filamento (10). Nossa seqüência apresenta um resíduo de lisina na posição 190, e um de cisteína na posição 374;

A tabela 2 e a figura 15 demonstram os resultados da homologia entre diferentes genes de actina:

Com relação a evolução das actinas, segundo Polard e Cooper (39), evidências baseadas na homologia entre seqüências de aminoácidos indicam que todas as actinas citoplasmáticas presentes em organismos pluricelulares, bem como as actinas musculares de invertebrados, são descendentes de actina citoplasmática encontrada em fungos e protozoários . Entretanto, a posição dos íntrons revela que as actinas citoplasmáticas de vertebrados são próximas de actinas musculares e não musculares de invertebrados. O que pudemos estabelecer utilizando o gene de actina em *Trichoderma reesei* foi determinada seqüência consenso intrônica, responsável pelo "splicing" em estrutura de laço que correspondente àquela apresentada em vertebrados, "CURAY", onde "R" representa purinas e "Y" representa pirimidinas, enquanto que em

Tabela 2:

Organismo	Gene	código GeneBank	no.bases alinhasdas; query; subjct; identidade	no. bases alinhasdas; query; subjct; identidade
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>actina</i>	XO7463	246; 1022-1267; 1245-1490 92%	128; 1371-1498; 1600-1727; 79%
<i>Emericella nidulans</i>	<i>gama actina</i>	M22869	250; 1018-1267; 989-1238; 90%	122; 1381-1502 1358-1479; 86%
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>actina</i>	K00673	247; 1021-1267; 100-346; 89%	132; 1371-1502; 456-587; 77%
<i>Bombix mori</i>	<i>actina 1</i>	X05185	247; 1021-1267; 127-696; 87%	90; 1590-1679; 702-971; 78%
<i>P. polycephalum</i>	<i>ardA/actina</i>	M15272	154 1021-1174; 340-493; 86%	132; 1371-1502; 973-1104; 78%
<i>Camundongo</i>	<i>alfa-actina</i>	M12233	247; 1021-1267; 7-253 86%	128; 1371-1498; 363-490; 75%
<i>Camundongo</i>	<i>actina muscular</i>	M12866	247; 1021-1267; 180-426; 86%	128; 1371-1498; 536-663; 74%
<i>Camundongo</i>	<i>befa actina *(pAL41)</i>	X03765	247; 1021-1267; 46-292; 86%	128; 1371-1498; 402-529; 80%
<i>Galina</i>	<i>alfa actina esquelética</i>	J00805	257; 1011-1267; 506-762 84%	118; 1381-1498; 1016-1133; 74%
<i>C. carpio</i>	<i>befa-actina</i>	M24113	244; 1021-1264; 1797-2040; 86%	128; 1371-1498; 2456-2583; 78%

query: região pesquisada sequência da actina de *Trichoderma reesei*;

subjct: região do gene de actina homólogo utilizada para comparação;

identidade: percentagem de identidade entre as regiões comparadas dos dois genes.

1-4, 10001
2-4, 10001. GAAATTCCTATTTCCTACTCTAGACTGGCGTGTTCGCCCATTTGAGCCGCGCGGCAATGGAT
3-E. nidulans.

CTTGGCAGACCAGAAAATGGGTATTCCTTACCATGTCCTTCCTGCTAGAGTGGCTAGATATGCGG

AAAGGAGAAACATTTTGTGACGGCAAAGGAACACCGATCATTCAGGGAGACAGGGAGTGGC

-381GGTACCTCGAGCG

• 36/ GGCTTGAGTACCTCCGACCGAAGTAAAHNCCTCCCTAAATACCTAAAGCGCTCTCCGC

-307 TGGTTCGGCCGCTCCACACACAGCAGGCTGCCCCACCAGGCAATTGTCCGCCCCACAA

-247 CTGTGCCCATCGTGGCAGCGGAGTTACTTACTTCCCTCCTTTCCNCCCCCTTCACTCTTT

-187 CTACITCTTCAACAGCACCCACCCCCCAATCGCCAGCTTTCGACTGCGTGTCACTTAA

-127 TATTTCTCACTTCAACCFNTTTTTATCTCTCTCAGCAAACCTCGAGATCCTGGATGGG

-67 AGCTTCGTCTCTGTCTATCTTCGCCCTCTTCAAGTCTTTCATCAGCTTCATACATTAAATC

1M. E.

.....M.E.....

cattttctctggacacctcagcgacttctgc.tccccttgggacgcttcttggcaatata

3 R. R. V. A. A. L

.....E..E..V..A..A..L

9 ..V..I..D.,N..G.....

..V..I..D..N..G.....

cc.atcccacctct..atcctccccctcattcct..gct.ccccaatcaaaq.....

.....

gcgattgctctttctcgag...tctggacatgaattcgaa.gctgaca.gctggc..ca.
tctggacatgaattcgaa.gctgaca.gctggc..ca.

14S..G..M..C..K..A..G..F..A..G..D..D..A..P..R..A..V
115

.....H..G..M..C..K..A..G..F..A..G..D..D..A..P..H..A..V

CTTCCgtangtc...ccgaccccaact...gtgc.....cctctcgca.cctcc
 (TTTCCgtatutugcgttttgtgttttatataaacggttacttctccggttgaatttgc

aagccctgagatagcaq.....gatagcgtac.ttcggacgcctctq.ctcncq..tc

[illegible]

.....

...tactgacaga...gcatacggtccatcggtcggtcccgccatcatg...ggaattacc

43TATCA

.....X.....

GATTGGTATGGGT'CAGAAGGACTCGTACGTGGGCGATGAGGCCAGTCCAAGCGTGCTG

65 ..L..T..L..R..Y..P..I..E..H..G..V..V..T..H..W..D..D..M..E..

..L..T..L..R..Y..P..I..E..H..G..V..V..T..N..W..D..D..H..E..

GATGTGGCACCACACCTTCTACAATGAGTTGGGTGTTGCTCCCGAGGAGCACECCGTCG

[illegible]

Figura 15: As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da actina de 1-*T. reesei*, 2- *Thermomyces lanuginosus*, e 3- *Emericella nidulans* foram alinhadas. As regiões correspondentes aos íntrons estão representadas com letras minúsculas e as correspondentes aos éxons com letras maiúsculas. Os aminoácidos foram representados com o código de uma letra, sendo aqueles na linha superior correspondentes ao gene de *T. reesei*, e na linha inferior correspondentes ao gene de *E. nidulans*.

levedura a seqüência consenso para este tipo de processamento é "UACUAC" (60). O que aponta para um possível relacionamento mais estreito entre a actina de eucariotos superiores.

A actina seqüenciada é do tipo não muscular, pois *Trichoderma reesei* não apresenta movimentos contráteis. Além disso, as moléculas de actina possuem a extremidade N-terminal bloqueada por um grupo acetil, que é adicionado após a síntese. O resíduo de metionina inicial é acetilado e removido enzimaticamente. Em actinas não musculares, o próximo resíduo, após a metionina inicial, é um ácido aspártico, que é acetilado. Em actinas musculares, o próximo resíduo, após a metionina, é uma cisteína que é acetilada e removida, sendo exibido o próximo resíduo que é um ácido aspártico ou glutâmico, que é acetilado completando o processo (48, 45). A seqüência aqui apresentada possui a seguinte região N-terminal : Met-Asp-Gly.....

IV.5 - Características da Região Promotora do Gene de Actina em *Trichoderma reesei*

A seqüência da base número 1 até 380 corresponde a região que provavelmente contém as seqüências em cis responsáveis pelo controle da expressão do gene. A partir desta seqüência pesquisamos para homologia (90%) em um banco de dados contendo seqüências regulatórias. Utilizando o programa "Seqaid", encontramos (figura16):

a) Região -70 (CCAATT): posição -180; b) Região rica em GC/Sítio para ligação de SP1 (5) (GGGCGG): posição -258; c) Região rica em CT: posição -94

-380

GGTACCTCGAGCCGGGCCCCGGAGTACCCCGAGCGA
 AGCAAACCCCCCCCCCAAATCACCCAAGGCGCTCTC
 GCCTGGTTCGCCGCCTCCACACACCAGCAGGCTGC
 CCCACCAGGCAATTGTCCCGCCCACAACGTGTGCCCAT
 CGTGGCAGCGGAGTTACTTACTTCCCTCCTTTCCNCC
 CCCTCCACTCTTTCTACTTCTTCAACAGCACCCACCC
 CCCCAATCGCCAGCTTTGCGACTGCGTGTCACCTTAA
 TATTTCTCACTTCAACCCTNTTTTTATCTCCTTCAGC
 AAACCTCGAGATCCTGGATGGGAGCTTCGTCTCTGT
 CTATCTTCGCCCTCTTCAAGTCTTTCATCAGCTTCAT
 ACATTAATCAGTCACA→+1

Figura 16: Representação da região promotora do gene de actina de *T. reesei*. As regiões destacadas referem-se a seqüências regulatórias em cis.: CG BOX, CAT BOX e CT BOX, sendo esta última presente com freqüência em promotores de genes que não possuem TATA BOX

Como podemos notar, este promotor tem características daqueles controladores da expressão de genes constitutivos, onde não encontramos "TATA BOX", porém está presente uma região rica em GC, que também é sítio para o fator de transcrição SP1, que é requerido para a transcrição do vírus simiano 40 (SV40). Este tipo de promotor para genes constitutivos de eucariotos já foi descrito, inclusive para eucariotos inferiores (31). A seqüência rica em CT também aparece com freqüência em genes onde não encontramos TATA BOX (40).

IV.6 - Utilização do Gene de Actina Clonado

Dos pesquisadores que trabalham com a expressão das enzimas celulolíticas deste fungo, o isolamento e seqüenciamento deste gene de actina recebeu um considerável interesse. Dentro deste laboratório duas linhas estão utilizando ativamente os dados e insumos desta dissertação:

O gene de actina de *T. reesei* vem sendo usado como sonda controle em experimentos para a verificação da estabilidade do mRNA dos genes celulolíticos; este mesmo plasmídio usado como sonda para "northern blot" permite a verificação de diferenças quantitativas entre os genes reguláveis por diferentes fontes de carbono, desde que o gene de actina é independente destas variações nutricionais (figura 17);

Figura 17: "Northern Blot" no qual 2,5 μ g de RNA total de *T. reesei* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2 %, onde: linha 1, o RNA foi extraído do fungo crescido em glicerol; linha 2, o RNA foi extraído do fungo induzido com avicel; linha 3, o RNA foi extraído do fungo reprimido por glicose. **A)** Hibridizado com sonda de *cbh1* (Celobiohidrolase I) e **B)** Hibridizado com sonda de actina do próprio *T. reesei* (pKPN-1,9).

- A região 3' não traduzida do gene foi isolada, e será usada para construções que visam o estudo de sua importância para a estabilidade do mRNA, comparada com a mesma região dos genes celulolíticos;
- O promotor do gene está utilizado em construções que visam a comparação com os promotores celulolíticos.

Os resultados deste trabalho foram submetidos á revista Nucleic Acids Research (28).

V - Summary

The gene encoding actin in the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei* has been isolated and sequenced. The nucleotide sequence reveals that the gene is composed of 6 exons separated by 5 introns within the coding region. The positions of the introns were predicted by comparison of sequence homology to the genes coding for actin with known amino acid sequence and by identification of splice-site signal sequences. The actin protein of *Trichoderma reesei* shows extensive homology to the actins of other fungi *E. nidulans*, 95%, *T. lanuginosus*, 92% and *S. pombe*.

The *T. reesei* actin promoter has a CT-rich region, CAAT and GC. There is no obvious TATA sequence in the *T. reesei* actin promoter. The absence of TATA-like sequence were also observed in another genes of *T. reesei*.

An important aspect in molecular biology of filamentous fungi is the analysis, under a specific metabolic events, of the mechanism(s) regulating the expression of constitutive and induced genes. The filamentous fungus *Trichoderma reesei* is considered to be one of the most efficient producer of cellulase, and it serves as a model system for enzymatic cellulose hydrolysis. Expression of the cellulase genes are stringently regulated by the carbon source. Growth on cellulose results in induction of the cellulase transcripts, whereas glucose strongly represses their expression. The availability of a constitutive expressed genes of *T. reesei* provides not only important information regarding the molecular biology of the fungi, but also is essential for a better understanding of the mechanism(s) controlling the expression of the cellulase transcripts. Under inductive process of the of the major cellulase transcript (*cbh1*) and its repression by glucose, actin mRNA is constitutively expressed. The present results should be useful for further structural and functional analysis of the elements involved in inductive and constitutive expression of cellulase and actin transcripts.

VI - Referências Bibliográficas

1. Abrahão Neto, J. (1991) Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo
2. Alonso, S. J., Minty, A., Bourlet, Y. and Buckingham, M. - (1986) Comparison of three actin coding sequences in the mouse; actin genes of warm-blooded vertebrates - J. Mol. Evol. 23:11-22 -
3. Altschul, S.F., Gish, Warren, Miller, W., Mayers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment Search Tool - J. Mol. Biol. 215: 403-410.
4. Béguin, P. (1990) - Molecular biology of cellulose degradation Ann. Rev. Microbiol. 44: 219-248.
5. Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P., Tjian, R.T. (1986) - Purification and biochemical characterization of the promoter specific transcription factor, SP1 - Science 234: 47-52
6. Chen, C.M.; Gritzali, M. & Stafford, D.W. (1987) - nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* Bio/Technol. 5: 247-278.
7. Chet, I (1987) *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Innovative Approaches to Plant Disease Control. Chet, I (ed.) New York: J. Wiley & Sons, pp 137-160
8. Coughlan, M.P., (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 3: 39-109

- 9.El-Gogary, S.; Leite, A.; Crivellaro, O.; Eveleigh, D. & El-Dorry, H.- (1989) Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei* Proc. Natn. Acad. Sci. USA 86: 6138-6141.
- 10.Elzinga, M., Phelan, J.J. - F-actin is intermolecularly crosslinked by N,N'-p-phenylene-dimaleimida through lysine 191 and cysteine 374 Proc. Natn. Acad. Sci. USA 81: 6599-6602
- 11.Eveleigh, E.D - Biofuels and oxychemicals from natural polymers - a perspective. *In*: Current Perspectives in Microbial Ecology, Eds. M.J. Klung and C.A. Reddy. pg. 553-557. Pub. Amer. Soc. Microbial. Washington. D.C.
- 12.Eveleigh, E.D.(1985)- *Trichoderma*, Biol. Ind. Microorg. in Biotechnol. Ser. 6:648-509.
- 13.Fagerstam, L.G. & Pettersson, L.G.F. (1980)- The 1,4, β -glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM 9414 FEBS Lett. 119: 97-100
- 14.Fan, L.T.; Gharpuray, M.M. & Lee,Y.H.(1987)- Cellulose hydrolysis Biotechnology Monographs. Vol. 3, Springer Verlag, Berlin.
- 15.Fornwald, A.F., Kuncio, G., Peng, I. and Ordahl, C.P. (1982)- The complete nucleotide sequence of the chick α -actin gene and its evolutionary relationship to the actin gene N.A.R. 10:3861-3876
- 16.Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. & Schulein, M. (1985)- Synergism of cellulase from *Trichoderma reesei* in degradation of cellulose - Bio/Technology 3: 722-726.
- 17.Hulme, M.A. & Stranks, D.W.(1970) - Introduction and the regulation of production of cellulase by fungi - Nature (London) 226: 469-470.

18. Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W. & Wolfgang, G.K. (1990)- Atomic model of actin fragment - Nature 347: 44-49
19. Johnson. P.F. & Mc Kniht (1988)- Eukaryotic transcriptional regulatory proteins -Ann. Rev. Biochem. 58: 799-839
20. Kabsh, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. & Holmes, K.C. (1990)- Atomic structure of actin:DNase I complex - Nature 347: 37-44
21. Kaster, K. R., Burgett, S. G., Rao, R. N., and Ingolia, T. D. (1983) Analysis of bacterial higromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. N.A.R. 11:6895-6911
22. Kvist, S., Bregegere, F., Rask, L., Cami, B., Garoff, H., Daniel, F., Wiman, K., Larhammar, D., Abastado, J.P., Gachelin, G., Peterson, P.A., Dobberstein, B., and Kourilsky, P. (1981) - cDNA clone coding for part of a mouse H-2^d major histocompatibility antigen - PROC. NATN. ACAD. SCI. USA 78: 2772-2776
23. Li, L.H. Flora, R.M. & King, K.W. (1965)- Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma reesei* - Arch. Biochem. Biophys 111: 439-447.
24. Ljungdahl, L.G. & Eriksson, K.E. (1985)- Ecology of microbial cellulose degradation - Adv. Microbial Ecol. 8: 237-299.
25. Lombardo, A., Cereghino, G.P., and Scheffer, I.E. (1992)- Control of mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in *Sacharomyces cerevisiae* - Mol. Cell. Biol. 12: 2941-2948
26. Mandels, M. & Reese, E.T. (1960)- Induction of cellulase in fungi by cellobiase - J. Bacteriol. 79, 816-826.

- 27.Mandels, M., Parrish, F.W. & Reese, E.T. (1962)- Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei* - J. Bacteriol. 83: 400-408.
- 28.Mandels, M.; Parrish, F.W. & Reese, E.T.(1962)- Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei* - J. Bacteriol. 83: 400-408.
- 29.Maniatis, T.; Frisch, E.F. & Sambrook, J. (1982)- Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York..
- 30.Marchessault, R.H. & Sundararajan, P.R. (1983)- Cellulose - In: The Polysaccharides. (ed. Aspinall, G.B.) V.2 p.12-97, Academic Press, New York, N.Y..
- 31.Marques, M.V. and Gomes, S.L. (1992)- Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii* - J. Biol. Chem. 267: 17201-17207
- 32.Matsudara, Paul, (1991)- Molecular organization of actin crosslinking proteins TIBS 16:87-92
- 33.McLaugh, P.J., Gooch, J.T., Mannherz & Weeds, A.G. (1993)- Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing - Nature 364: 685-692
- 34.Montenecourt, B.S. & Eveleigh, D.E. (1979)- Selective screening for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei* - Adv. Chem. Ser. 181, 289-301.
- 35.Nevell, T.P. & Zeronian, S.H.(1985)- Cellulose chemistry fundamentals. In: Cellulose Chemistry and its Applications. (eds., T.P. Nevel and S.H. Zeronian) p. 1-29. John Wiley and Sons. New York, N.Y.

36. Ng, R., Abelson, J. (1990)- Isolation and sequence of the gene for the actin in *Sacharomyces cerevisiae* - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 3912-3916
37. Nisizawa, T., Suzuki, H. & Nisizawa, K. (1971)- "De novo" synthesis of cellulose induced by sophorose in *Trichoderma viridae* cells - J. Biochem. (Tokyo) 70, 387-393
38. Penttilä, M.; Lehtovaara, P.; Nevalainen, H.; Bhikhabhai, R. & Knowles, J. (1986).- Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei* complete nucleotide sequence of endoglucanase I gene - Gene 45: 253-263
39. Pollard, Thomas, D. (1986)- Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Ann. Rev. Biochem. 55: 987-1035
40. Punt, P.J., Dingemense, M.A., Kuyvenhoven, A., Soede, R.D.M, Pouwels, P.H. and Van den Holdel, CAMJJ: Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Gene 93:101-109
41. Reese, E.T., and M. Mandels (1984)- Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase - Ann. Rept. Ferm. Proc. 7:1-20
42. Rouvinen, J.; Bergfors, T.; Teeri, T.; Knowles, J.K.C. & Jones, T.A.-(1990) Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* - Science 249: 380-386

43. Saloheimo, M.; Lehtovaara, P.; Penttilä, M.; Teeri, T.T.; Stahlberg, J.; Johansson, G.; Pettersson, G.; Claeyssens, M.; Tomme, P. & Knowles, J.K.K. (1988)- EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme - Gene 63: 11-21.
44. Sanger, F., Nicklen S. & Coulson, A. R.(1977) - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 5463-5470
45. Solomon, L.R., Rubenstein, P.A. (1985)- Correct NH₂-terminal processing of cardiac muscle α -isoactin (Class II) in a nonmuscle cell - J. Biol. Chem. 260: 7659-7664
46. Stenberg, D. & Mandels, G.R. (1979)- Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose - J. Bacteriol. 139: 761-769
47. Straub, F.B. (1942) in: Studies - University of Szeged II, 3-15
48. Strauch, A.R., Rubenstein, P.A. (1984)- A vascular smooth muscle α -isoactin intermediate in BC3H1 cells - J. Biol. Chem. 259: 7224-7229
49. Sutoh, K. (1982)- Identification of myosin binding sites on the actin sequence - Biochem. 21: 3654-3661
50. Sutoh, K., et al.(1991) - Site directed mutations of Dictyostelium actin: disruption of a negative charge cluster at N terminus - Proc. Natn. Acad. Sci. USA 88: 7711-7714
51. Tangnu, S.K., Blanch, H.W. & Wilke, C.R.(1981) - Enhanced production of cellulase, hemicellulase and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C30) - Biotechnol. Bioeng. 23, 1837-1849

52. Teeri, T.; Lehtovaara, P.; Kauppinen, S.; Salovuori, I. & Knowles J. (1987)- Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II - Gene 51: 43-52.
53. Teeri, T.; Salovuori, I. & Knowles. (1983)- The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. J. Bio/Technol. 1: 696-699.
54. Timberlake, W.E. & Marshall, M.A. (1986)- Genetic engineering of filamentous fungus Science 244: 1313-1317
55. Urioste, J.C.C. (1989)- Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
56. Urioste, J.C.C., Henrique Silva, F., El-Gogary, S., Neto, J.A., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A., El-Dorry, H. (1993)- Triggering of the *Trichoderma* cellulolytic system requires its own basal expression - submetido
57. Vaheri, M., Leisola, M. & Kauppinen, V. (1979)- Transglycosylation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei* - Biotech. Lett. 1: 41-46
58. Van Arsdell, J.N.; Kwok, S.; Schweickart, V.; Ladner, B.; Gelfand, D.H. & Innis, M.A. (1987)- Cloning, characterization, and expression in *Sacharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* - Bio/Technol. 5: 60-64.
59. Vandekerckhove, J.S., and Weber, K., (1984)- Chordate muscle actin differ distinctly from invertebrate muscle actin - J. Mol. Biol. 179: 391-419

- 60.Voet, D. and Voet, J. (1991) - in: Biochemistry, eds. John Wiley & Sons (USA)
- 61.Warzywoda, M., Ferre, V. & Pourquie, J. (1983)- Development of a culture medium for large-scale production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* - Biotechnol. Bioeng. 25: 3005-3012
- 62.Way, M. and Weeds, A. (1990)- Cytoskeletal ups and downs - Nature 344: 292-294
- 63.White, A.R. & Brown, Jr., R.M. (1981)- Enzymatic hydrolysis of cellulose: visual characterization of the process - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1047-1051
- 64.Whittaker, P., Campbell, A.J.B., Southern, E.M., and Murray, E.N. (1988)- Enhanced recovery and restriction mapping of DNA fragments cloned in a new λ vector - N.A.R. 16: 6723-6739 -
- 65.Wolfgang, K., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. & Holmes, K. (1990)- Atomic structure of the actin: DNase I complex - Nature 347: 37-44
- 66.Wood, T.M. (1989b) Enzyme systems for lignocellulose degradation (ed. M. Coughlan) pp 17-35. Elsevier Applied Science, London, U.K.