



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Identificação e caracterização de um novo fator de transcrição, homólogo ao Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na regulação da expressão de celulases no fungo filamentoso *Trichoderma reesei*

AMANDA CRISTINA CAMPOS ANTONIÊTO

RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO

2018

AMANDA CRISTINA CAMPOS ANTONIÊTO

Identificação e caracterização de um novo fator de transcrição, homólogo ao Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na regulação da expressão de celulasas no fungo filamentosso *Trichoderma reesei*

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: Dr. Roberto do Nascimento Silva

RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO

2018

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Antoniêto, Amanda Cristina Campos.

Identificação e caracterização de um novo fator de transcrição, homólogo ao Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na regulação da expressão de celulases no fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. Ribeirão Preto: USP, 2018.

116 p. il., 30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Dr. Roberto do Nascimento Silva

1. *Trichoderma reesei*. 2. Azf1. 3. Celulases. 4. Regulação da expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA CRISTINA CAMPOS ANTONIÊTO

Identificação e caracterização de um novo fator de transcrição, homólogo ao Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na regulação da expressão de celulasas no fungo filamentosso *Trichoderma reesei*.

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

Aprovada em: ___/___/_____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

***Aos meus pais, Gilson e Nivalda.
Sem vocês nada disso seria possível.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado toda minha caminhada até aqui. Pela sabedoria e tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e por me amparar nos momentos de dificuldade.

Um agradecimento muito especial para o meu orientador, Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva. Obrigada pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por confiar no meu trabalho, por me ajudar a crescer na minha vida acadêmica e pela sua amizade. Você é um exemplo e inspiração para mim!

Ao Prof. Dr. Rafael Silva-Rocha que participou deste trabalho desde o início. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e pelas sugestões ao longo desses quatro anos.

Aos meus pais, Gilson e Nivalda, por não medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por entenderem os momentos de ausência, por compartilharem comigo as minhas conquistas e por serem o meu porto seguro sempre. Sei que o meu sonho é também o sonho de vocês!

Ao meu namorado, Diego, que está ao meu lado desde o início da nossa graduação em Bioquímica. Obrigada por ser meu companheiro de vida! Seu carinho, amizade e amor tornam meus dias mais felizes. Amo você!

À minha querida irmã, Bianca, por estar presente em todos os momentos, e aos meus avós, tios e primos que sempre me deram força para seguir no caminho que escolhi. Agradeço também à família do meu namorado por ter me acolhido com tanto carinho. Obrigada por se preocuparem comigo e pela disposição em me ajudar todas as vezes que precisei. Vocês são muito importantes pra mim!

À família LBM: Alinne, Cláudia, Douglas, Karol, Lili, Mari Costa, Mari Zerbini, Renatinho e Wellington. Com vocês eu descobri que o trabalho pode ser muito mais prazeroso e divertido quando os colegas deixam de ser simplesmente colegas, para se tornarem amigos! Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas, pelo cafezinho da tarde, por todas as risadas e também por me ouvirem nos momentos de desespero. Não tenham dúvida que essa jornada se tornou mais

leve ao lado de vocês! Claro que não poderia deixar de agradecer à minha querida amiga Marcelaine que chegou ao laboratório e com pouco tempo conquistou meu coração. Você faz muita falta por aqui! Todos vocês são muito especiais!

Às técnicas Zuleica e Sílvia, obrigada pela disposição em me ajudar todas as vezes que precisei, pelo suporte técnico e por serem sempre tão atenciosas! Foi um prazer ter vocês ao meu lado todos esses anos.

Aos meus queridos amigos de Ribeirão Preto Flávia, Fabinho, Karol, Luiz, Camila, Felipe, Sarah, André, Matheus e Deisy por todas as conversas, risadas, por dividirem comigo os momentos felizes e também os mais difíceis.

Aos meus amigos de longa data Alan, Alinne, Bruno, Carol e Fernanda. Nem preciso dizer o quanto vocês representam em minha vida né? Obrigada por me mostrarem que a verdadeira amizade permanece viva mesmo com o tempo e a distância.

Ao Prof. Dr. Axel A. Brakhage e Dr. Peter Hortschansky por terem me recebido e orientado no Hans Knöll Institute durante o meu estágio no exterior.

Às Prof^{as}. Dr^a. María Eugenia Guazzaroni, Dr^a. Fernanda Zanolli Freitas e Dr^a. Maria Célia Bertolini pelas discussões científicas e pela disposição em me ajudar com esse trabalho.

Aos colaboradores do *São Paulo Fungal Group* pelas contribuições científicas e sugestões nesse trabalho.

Aos alunos do SSBLab, principalmente Léo e Luísa, pelo auxílio nos experimentos e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao Thiago Aparecido da Silva pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Imunologia por todo conhecimento compartilhado durante o doutorado e por disponibilizarem seus laboratórios para a utilização dos aparelhos imprescindíveis para realização deste trabalho.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho. Um agradecimento

especial à Ivone, por me ajudar com tanta eficiência todas as vezes que foi necessário.

À FAPESP pela bolsa de doutorado e auxílio financeiro na execução desse projeto (Processos 2014/09493-2 e 2016/15605-3).

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

Muito obrigada!

[...] “Não é sobre chegar no topo do mundo

E saber que venceu

É sobre escalar e sentir

Que o caminho te fortaleceu

É sobre ser abrigo

E também ter morada em outros corações

E assim ter amigos contigo

Em todas as situações

A gente não pode ter tudo

Qual seria a graça do mundo se fosse assim?

Por isso, eu prefiro sorrisos

E os presentes que a vida trouxe

Pra perto de mim

Não é sobre tudo que o seu dinheiro

É capaz de comprar

E sim sobre cada momento

Sorriso a se compartilhar

Também não é sobre correr

Contra o tempo pra ter sempre mais

Porque quando menos se espera

A vida já ficou pra trás” [...]

RESUMO

ANTONIÊTO, A. C. C. **Identificação e caracterização de um novo fator de transcrição, homólogo ao Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na regulação da expressão de celulases no fungo filamentoso *Trichoderma reesei*.** 2018. 116 p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O fungo *Trichoderma reesei* é conhecido por sua elevada capacidade de secreção de enzimas celulolíticas que atuam degradando o polímero de celulose em moléculas de glicose, sendo este um ponto chave na produção do etanol de segunda geração. O presente trabalho tem por objetivo contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de desconstrução da biomassa por *T. reesei* através da identificação de novos fatores de transcrição associados a este processo. Para isso, foi realizado um *screening* de 14 fatores de transcrição potencialmente envolvidos com a degradação de biomassa e identificação do gene Tr103275, homólogo ao regulador Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, foi feita a construção de um mutante com deleção do gene *azf1* em *T. reesei*. Durante o crescimento em celulose e bagaço de cana, o gene *azf1* foi altamente expresso em *T. reesei*, ao passo que glicose reprimiu a expressão gênica desse fator de transcrição. A ausência de *azf1* afetou o crescimento e a esporulação em *T. reesei*, uma vez que a linhagem mutante produziu esporos menores e em quantidade reduzida em relação ao parental. Além disso, a proteína TrAzf1 atua como um regulador positivo da expressão de enzimas holocelulolíticas, considerando que as os genes que codificam as CBHs, EGs, BGs e *xyn4* foram *down* regulados no mutante $\Delta azf1$ em celulose e bagaço de cana. O sítio de ligação para TrAzf1 foi predito nesse trabalho através de análise de bioinformática. Para avaliar a interação de TrAzf1 com esse sítio de ligação no DNA, o motivo dedo de zinco de Azf1 recombinante foi obtido por expressão heteróloga em *E. coli* e utilizado nas análises de SPR. No entanto, a validação da interação fator de transcrição-DNA por SPR não foi conclusiva e outros experimentos devem ser realizados para validar o motivo de ligação de TrAzf1 em *T. reesei*. O papel de Azf1 na regulação da degradação da biomassa vegetal foi descrito, pela primeira vez, nesse trabalho. Esse fator de transcrição é um alvo em potencial para manipulação genética de *T. reesei*, visando o melhoramento da produção de enzimas holocelulolíticas por essa espécie.

Palavras-chave: 1. *Trichoderma reesei*. 2. Azf1. 3. Celulases. 4. Regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

ANTONIÊTO, A. C. C. **Identification and characterization of a new transcription factor, homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Azf1, involved in the regulation of cellulase expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** 2018. 116 p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The fungus *Trichoderma reesei* is known for its high capacity in secrete cellulolytic enzymes that act in the degradation of the cellulose polymer into glucose molecules, being a key point in the production of second generation ethanol. The present work aims to contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved in the process of biomass deconstruction in *T. reesei* through the identification of new transcription factors associated to this process. For this, we screened 14 transcription factors potentially involved in the degradation of biomass and identified the gene Tr103275, homologous to the Azf1 regulator of *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriorly, a mutant strain with deletion of *azf1* was obtained. During growth in cellulose and sugarcane bagasse, *azf1* was highly induced in *T. reesei*, while glucose repressed the gene expression of this transcription factor. The absence of *azf1* affected growth and sporulation in *T. reesei*, since the mutant strain produced less and smaller spores relative to the parental strain. In addition, we have shown that TrAzf1 acts as a positive regulator of the expression of holocellulolytic enzymes, whereas the genes coding for CBHs, EGs, BGs and *xyn4* were down-regulated in the $\Delta azf1$ mutant in cellulose and sugarcane bagasse. The binding site for TrAzf1 was predicted in this work through bioinformatics analysis. To evaluate the interaction of TrAzf1 with this DNA binding site, the recombinant Azf1 zinc finger motif was obtained by heterologous expression in *E. coli* and used in the SPR analyzes. However, validation of the transcription factor-DNA interaction by SPR was not conclusive and other approaches should be performed to validate the binding motif of TrAzf1 in *T. reesei*. The role of Azf1 in regulating the degradation of plant biomass was described for the first time in this work. This transcription factor is a potential target for the genetic manipulation of *T. reesei*, aiming to improve the production of holocellulolytic enzymes by this species.

Keywords: 1. *Trichoderma reesei*. 2. Azf1. 3. Cellulases. 4. Regulation of gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura da lignocelulose.** O principal componente da lignocelulose é a celulose, um polissacarídeo formado por unidades repetidas de glicose unidas através de ligações $\beta(1,4)$. A hemicelulose, segundo componente mais abundante da lignocelulose, é composta por açúcares de 5 e 6 carbonos como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é constituída de três componentes fenólicos principais denominados álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Juntas, essas três estruturas formam as microfibrilas, que estão organizadas em macrofibrilas que garantem a estabilidade estrutural da parede celular vegetal (Adaptação de *Genome Management Information System*, 2005). 27
- Figura 2. Comparação entre as principais características do genoma de *T. reesei* com as outras quatro espécies mais bem estudadas quanto à degradação de biomassa e *S. cerevisiae*.** A) Análise filogenética entre as seis espécies analisadas. B) Tamanho do genoma. C) Conteúdo gênico. D) Proporção de fatores de transcrição, transportadores e CAZymes (Adaptação de Gupta et al., 2016). 31
- Figura 3. Modelo enzimático de degradação da celulose.** Inicialmente, as endoglucanases (EG) e celobiohidrolases (CBH) degradam a celulose em oligossacarídeos mais simples, principalmente celobiose. Em seguida, as β -glicosidases hidrolisam a celobiose, originando moléculas de glicose. A enzima GH61 participa desse processo através da degradação oxidativa da celulose. Em conjunto, essas proteínas proporcionam a desconstrução da biomassa vegetal (Adaptação de Horn et al., 2012). 35
- Figura 4. Visão global da regulação da expressão das celulasas em *T. reesei*.** A expressão dos genes celulolíticos é controlada pelos fatores de transcrição principais: XYR1, ACE1, ACE2, ACE3, CRE1 e o complexo HAP2/3/5. Além disso, a proteína LAE1, uma metiltransferase putativa, e VELVET mostraram-se importantes na expressão dos genes de celulasas. Sob condições de glicose elevada, *T. reesei* não induz a expressão de celulasas e o fator de transcrição CRE1 é o responsável por mediar o mecanismo de repressão catabólica de carbono. Além dos fatores de transcrição já conhecidos, novas proteínas regulatórias ainda não caracterizadas podem participar da ativação ou repressão, direta ou indireta, dos principais fatores de transcrição envolvidos com a expressão das celulasas (Adaptação de Gupta et al., 2016). 39
- Figura 5. Estrutura de um motivo dedo de zinco do tipo C_2H_2 .** A) Esse motivo é caracterizado por formar estruturas secundárias com duas folhas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice. O íon zinco participa da estabilização da estrutura desse motivo (Adaptação de Razin et al., 2012). B) Predição 42

da estrutura do Azf1 de *T. reesei*.

- Figura 6. Representação esquemática da construção do vetor mediada por recombinação em levedura.** Para a construção do cassete de deleção, as regiões promotora, terminadora e o gene de resistência à higromicina são amplificados e montados no vetor pela levedura *S. cerevisiae* (Adaptação de Schuster et al., 2012). 50
- Figura 7. Mapa do plasmídeo pRS426.** Esse vetor foi utilizado na transformação da levedura SC9721 para montagem do cassete de deleção gênica. 52
- Figura 8. Mapa do plasmídeo pET42bTrAzf1234-370.** O plasmídeo possui a sequência do gene sintético TrAzf1234-370, a *tag* GST, o sítio de clivagem para a protease TEV e resistência à canamicina. 61
- Figura 9. Fatores de transcrição potencialmente associados à degradação da biomassa em *T. reesei*.** Em *S. cerevisiae*, os motivos identificados correspondem às proteínas regulatórias AZF1, SFL1, MOT3, RME1 e MAC1. Os principais homólogos em *T. reesei* foram obtidos com auxílio da ferramenta BLAST. 68
- Figura 10. Atividades enzimáticas da linhagem QM9414 crescida em bagaço de cana.** O sobrenadante foi obtido nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A) CMCase (endoglucanase). B) FPase (celulase total). 69
- Figura 11. Dosagem de glicose.** A linhagem QM9414 foi cultivada em bagaço de cana por 24, 48, 72 e 96 horas e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de glicose utilizando o kit Glicose Liquiform. 70
- Figura 12. Expressão gênica absoluta através de qRT-PCR dos fatores de transcrição candidatos.** Cinco genes mostraram-se mais expressos durante o cultivo em bagaço de cana quando comparado à glicose. São eles: Tr38080, Tr122767, Tr103275, Tr3856 e Tr120475. A escala do heat map indica a expressão absoluta dos genes avaliados. O software Mev 4.8.1 foi utilizado para a construção do *heat map*. A clusterização gênica foi feita pelo método average linkage utilizando a correlação de Pearson como distância métrica. 71
- Figura 13. Expressão do gene *azf1* em diferentes fontes de carbono.** A expressão gênica foi obtida por qRT-PCR usando actina como controle endógeno. A) Celulose. B) Bagaço de cana e glicose. 72
- Figura 14. Árvore filogenética dos homólogos de Azf1 de diferentes espécies.** A árvore foi criada pelo programa Mega 4 com 1000 *bootstraps*. 73
- Figura 15. Montagem do cassete pela levedura *S. cerevisiae*.** A) Gel de agarose mostrando os produtos de PCR purificados das regiões 5', 3' e do gene de resistência à higromicina. B) Gel de agarose mostrando a amplificação do cassete de deleção de 3350 pares de base referente ao 74

gene Tr103275.

- Figura 16. Confirmação da deleção do gene Tr103275 (*azf1*) por PCR.** 75
A) Amplificação das ORF do gene Tr103275 (1508 pb) apenas na linhagem parental. B) qRT-PCR mostrando que o gene *azf1* de *T. reesei* só é expresso na linhagem parental. P: parental; M: mutante.
- Figura 17. Estratégia de deleção e confirmação do mutante $\Delta azf1$.** 76
A) Para o southern blot, os DNAs das linhagens parental e mutante foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI, resultando em dois fragmentos de 6.2 kb e 2.16 kb, correspondentes às linhagens parental e mutante, respectivamente. B) A construção da linhagem mutante foi realizada substituindo a ORF do gene *azf1* (Tr103275) pelo gene de resistência à higromicina (*hph*). A análise de Southern blot confirmou a obtenção dos fragmentos esperados: 6.2 kb na linhagem parental e 2.16 kb no mutante $\Delta azf1$.
- Figura 18. *Azf1* está relacionado com o controle do crescimento em diferentes fontes de carbono.** 77
As linhagens parental e mutante $\Delta azf1$ foram cultivadas em placas de meio mínimo contendo 1% de amido, celulose, glicerol, glicose, lactose, sacarose e PDA. A incubação foi realizada a 28 °C e o crescimento foi registrado no quarto e sétimo dias.
- Figura 19. A deleção de *azf1* pode afetar o crescimento em resposta ao pH ambiente.** 78
As linhagens parental e mutante e $\Delta azf1$ foram cultivadas em placas de PDA com pH ajustado para 5,0, 7,0, 9,0 e 11,0. A incubação foi realizada a 28 °C e o crescimento foi registrado no quarto e sétimo dias.
- Figura 20. Crescimento das linhagens parental e $\Delta azf1$ em *race tubes*.** 79
O crescimento das duas linhagens foi observado durante 14 dias e mostrou-se semelhante. No entanto, elas mostraram um perfil de esporulação diferente, uma vez que o mutante esporulou menos que a linhagem parental.
- Figura 21. *Azf1* está envolvido nos mecanismos de esporulação em *T. reesei*.** 79
Esporos da linhagem mutante são menores do que na linhagem parental (11,5% de esporos pequenos em $\Delta azf1$ e 4,7% de esporos em pequenos em TU6_ $\Delta ku70$).
- Figura 22. Análise da incorporação de iodeto de propídio (PI) pelas linhagens de *T. reesei* TU6_ $\Delta tku70$ e $\Delta azf1$.** 80
A fluorescência emitida pelo PI foi medida para 10 mil eventos (100%). As áreas M1 e M2 representam as células que se encontram nas fases G0/G1 e G2/M, respectivamente.
- Figura 23. Peso seco das linhagens do parental e mutante $\Delta azf1$.** 81
Não houve diferença estatística no crescimento das duas linhagens, indicando que elas são comparáveis.

- Figura 24. Os genes *cel7a*, *cel3a* e *cel7b* são afetados por Azf1.** As linhagens parental e $\Delta azf1$ foram cultivadas na presença de celulose e bagaço de cana durante 8, 12 e 24 horas e a expressão dos genes *cel7a*, *cel3a* e *cel7b* foi avaliada por qRT-PCR. 82
- Figura 25. Genes celulolíticos e hemicelulolíticos estão sob controle de Azf1 em *T. reesei*.** A expressão gênica de 17 celulases, 4 xilanases e da proteína solenina foi avaliada após o cultivo de TU6_ $\Delta tku70$ e $\Delta azf1$ em presença de celulose e bagaço de cana durante 8, 12 e 24 horas. O software Mev 4.8.1 foi usado para a construção do *heat map*. Os valores de expressão gênica estão em \log_2 . Os asteriscos indicam que há diferença estatística entre parental e mutante em pelo menos um dos tempos analisados; ***P < 0.001. 83
- Figura 26. Azf1 é um fator de transcrição de 506 aminoácidos.** A) Os quatro dedos de zinco presentes no Azf1 estão destacados em verde na sequência. B) Motivo de ligação ao DNA predito para Azf1. 84
- Figura 27. SDS-PAGE gel mostrando a expressão do complexo (GST fusionada à TrAzf1234-370) sob diferentes condições.** Os números 1, 2 e 3 correspondem a: (1) fração solúvel em LB (controle); (2) fração solúvel em TB e (3) fração insolúvel em TB. A) Indução a 25 °C. B) Indução a 30 °C. A proteína de fusão aparece a aproximadamente 40 kDa. 85
- Figura 28. A proteína pura foi obtida após quatro etapas de purificação.** O gel SDS-PAGE mostra os principais resultados da purificação de dedo de zinco de Azf1: o lisado total antes da purificação da proteína (linha 2), o *flowthrough* da coluna GSH Sepharose 4FF (linha 3) e o complexo dedo de zinco de Azf1-GST após a eluição com GSH (linha 4), o produto da clivagem com TEV (linha 5), o *flowthrough* da coluna HiTrap QFF (linha 6), a GST no *flowthrough* da coluna SP Sepharose (linha 7), a fração eluída da coluna de SP Sepharose (linha 8) e a proteína pura após a cromatografia de exclusão molecular (linha 9). FT: *flowthrough*. 86
- Figura 29. Sensogramas mostrando a cinética da interação para as sete concentrações de Azf1 e os DNAs dupla-fita.** A) *Flow cell* de referência (sem DNA). B) *cel7a*. C) *swc*. D) sítio de ligação de CBC. 88
- Figure 30. Sensogramas correspondentes à cinética (esquerda) e afinidade no estado estacionário (direita) do complexo Azf1-DNA após a subtração da *flow cell* de referências.** A) *cel7a*. B) *swc*. C) sítio de ligação de CBC. 90
- Figura 31. Sensogramas mostrando a cinética de interação entre Azf1 (200 nM) e os DNAs dupla-fita após a adição de PdIdC.** Nesse ensaio, diferentes concentrações do competidor não específico PdIdC foram utilizadas: 5, 10, 15, 20 and 25 $\mu\text{g/mL}$. A) *Flow cell* de referência (sem DNA). B) *cel7a*. C) *swc*. D) sítio de ligação de CBC. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas celulolíticas de <i>T. reesei</i> . Adaptação de Druzhinina e Kubicek, 2017.	33
Tabela 2. Primers utilizados para amplificação dos genes identificados na análise de bioinformática através de qRT-PCR.	48
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da <i>hph</i> e regiões promotora e terminadora do gene Tr103275.	51
Tabela 4. Primers utilizados para verificação dos possíveis mutantes.	57
Tabela 5. Primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR para análise da expressão dos genes holocelulolíticos.	59
Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados na análise de SPR.	64
Tabela 7. Resumo dos cálculos utilizados na imobilização do DNA, mostrando o peso molecular do ligante (M_w), R_{max} , R_L e o volume de DNA injetado nas <i>flow cells</i> .	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AA9 – do inglês, *Auxiliary activity 9*

AEBSF – do inglês, *4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

Azf1 – do inglês, *Asparagine-rich Zinc Finger protein*

BG – β -Glicosidase

CBC – do inglês, *CCAAT-binding complex*

CAZymes – do inglês, *Carbohydrate active enzymes*

CBH – Celobiohidrolase

CCR – do inglês, *Carbon catabolite repression*

ChiP-Seq – do inglês, *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*

CMC - Carboximetilcelulose

CMCase – Carboximetilcelulase

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

cDNA – DNA complementar

DNS - ácido dinitrosalicílico

EDTA - do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EG – Endoglicanase

EMSA - do inglês, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

FPase – do inglês, *Filter paper activity*

FSC-H – do inglês, *Forward scatter*

FT - do inglês, *Flowthrough*

GH - Glicosil hidrolase

GO – do inglês, *Gene ontology*

GST - Glutathiona S-transferase

Hph – do inglês, *hygromycin B phosphotransferase*

PI - do inglês, *Propidium iodide*

JGI – do inglês, Joint Genome Institute

LB - Luria-Bertani

LPMO – do inglês, *Lytic polysaccharide monooxygenases*

Mw - do inglês, *Molecular weight*

MAMPs - do inglês, *Microbe-associated molecular pattern*

MEV – do inglês, *MultiExperiment Viewer*
MEX – do inglês, *Malt extract*
ORF - do inglês, *Open reading frame*
PCR – do inglês, *Polymerase chain reaction*
qRT-PCR – PCR em Tempo Real
PDA - do inglês, *Potato dextrose agar*
PEG - Polietilenoglicol
RNA – Ácido Ribonucleico
RNA-seq – Sequenciamento de RNA de nova geração
RU - do inglês, *Resonance units*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SOC – do inglês, *Super optimal broth with catabolite repression*
SPR – do inglês, *Surface plasmon resonance*
SSC-H - do inglês, *Side scatter*
SWO - do inglês, *Swollenin*
TCEP – do inglês, *Tris(2-carboxyethyl)phosphine*
TE – Tris-EDTA
TEV - do inglês, *Tobacco Etch Virus*
ZF - do inglês, *Zinc finger*
YNB – do inglês, *Yeast Nitrogen Base*

SUMÁRIO

I) INTRODUÇÃO	23
II) LEVANTAMENTO TEÓRICO	27
II. 1) A biomassa lignocelulósica	27
II. 1. 1) Celulose	28
II. 1. 2) Hemicelulose	29
II. 1. 3) Lignina	29
II. 2) O gênero <i>Trichoderma</i>	30
II. 3) O sistema celulolítico de <i>T. reesei</i>	32
II. 4) Regulação transcricional dos genes de celulases	37
II. 5) O fator de transcrição Azf1	40
III) OBJETIVOS	44
IV) METODOLOGIA	46
IV. 1) Identificação de fatores de transcrição de <i>T. reesei</i> potencialmente associados à degradação da biomassa através de análises <i>in silico</i>	46
IV. 2) Avaliação da expressão gênica dos 14 fatores de transcrição identificados pela análise <i>in silico</i>	46
IV. 2. 1) Manutenção e crescimento do fungo	46
IV. 2. 2) PCR em tempo real (qRT-PCR) para avaliação da expressão gênica dos 14 fatores de transcrição identificados	47
IV. 3) Atividades enzimáticas e dosagem de glicose do QM9414 em bagaço de cana	48
IV. 3. 1) Atividade de CMCase	48
IV. 3. 2) Atividade de FPase	49
IV. 3. 3) Dosagem de glicose	49
IV. 4) Análise filogenética	49
IV. 5) Deleção do fator de transcrição Azf1 de <i>T. reesei</i>	49
IV. 5. 1) Amplificação das regiões promotora, terminadora e <i>hph</i>	50
IV. 5. 2) Digestão do vetor	51
IV. 5. 3) Transformação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC-9721	52
IV. 5. 3. 1) Preparo das células competentes	52
IV. 5. 3. 2) Transformação da levedura	53
IV. 5. 4) Extração do DNA genômico da levedura	53
IV. 5. 5) Amplificação do cassete de deleção	54
IV. 5. 6) Transformação da linhagem TU6_Δ <i>tku70</i>	54
IV. 5. 6. 1) Obtenção dos protoplastos	54
IV. 5. 6. 2) Transformação do fungo	55
IV. 5. 7) Extração do DNA genômico	56
IV. 5. 8) Confirmação da deleção de <i>azf1</i> na linhagem mutante	56
IV. 6) Avaliação do perfil de crescimento e esporulação da linhagem Δ <i>azf1</i>	57
IV. 7) Citometria de fluxo	58
IV. 8) Avaliação da expressão de genes holocelulolíticos no mutante Δ <i>azf1</i>	58

IV. 8. 1) Crescimento das linhagens parental e mutante em celulose e bagaço de cana	58
IV. 8. 2) qRT-PCR para avaliação da expressão dos genes celulolíticos	58
IV. 9) Predição do motivo de ligação de Azf1 ao DNA através de análise de bioinformática	60
IV. 10) Expressão heteróloga do motivo dedo de zinco de Azf1	60
IV. 10. 1) Linhagens e plasmídeos utilizados	60
IV. 10. 2) Transformação de <i>E. coli</i>	61
IV. 10. 2. 1) Transformação de <i>E. coli</i> DH5 α	61
IV. 10. 2. 2) Transformação de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	62
IV. 10. 3) Determinação dos parâmetros de expressão da proteína	62
IV. 10. 4) Expressão solúvel de TrAzf1234-370	62
IV. 10. 5) Purificação de Azf1	63
IV. 10. 5. 1) Preparação da amostra	63
IV. 10. 5. 2) Purificação do dedo de zinco de Azf1	63
IV. 11) Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	64
V) RESULTADOS	67
V. 1) Identificação dos fatores de transcrição de <i>S. cerevisiae</i> e respectivos homólogos em <i>T. reesei</i> possivelmente envolvidos na desconstrução da lignocelulose	67
V. 2) Atividades enzimáticas do QM9414: CMCase e FPase	68
V. 3) Dosagem de glicose do QM9414 em bagaço de cana	69
V. 4) Perfil de expressão gênica dos fatores de transcrição candidatos	70
V. 5) A expressão do homólogo de <i>azf1</i> de <i>T. reesei</i> é induzida pela biomassa vegetal e reprimida por glicose	71
V. 6) Análise filogenética do fator de transcrição Azf1	72
V. 7) O gene <i>azf1</i> foi deletado com sucesso <i>T. reesei</i>	73
V. 7. 1) A montagem do cassete de deleção pela levedura <i>S. cerevisiae</i>	73
V. 7. 2) Verificação dos possíveis mutantes obtidos	74
V. 8) O fator de transcrição Azf1 afeta o crescimento e esporulação em <i>T. reesei</i>	76
V. 9) Azf1 não está envolvido no controle do ciclo celular em <i>T. reesei</i>	80
V. 10) Azf1 é um regulador positivo da expressão de genes de celulasas	80
V. 11) O motivo de ligação ao DNA de Azf1 foi predito através de análises de bioinformática	83
V. 12) O motivo dedo de zinco de Azf1 recombinante foi produzido por expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	84
V. 12. 1) Azf1 é expresso em <i>E. coli</i> na fração solúvel	84
V. 12. 2) A proteína pura foi obtida após quatro etapas de purificação	85
V. 13) Investigação do motivo de ligação de Azf1 por SPR	86
V. 13. 1) Interação da proteína com o DNA dupla-fita	86
V. 13. 2) Análise de cinética e afinidade	89
V. 13. 3) Lidando com a ligação não específica	90
VI) DISCUSSÃO	94
VII) CONCLUSÃO	101
VIII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

IX) ANEXOS

114

IX. 1) ANEXO 1: Produção durante o doutorado

114

Introdução

I) INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis tais como o petróleo, o gás natural e o carvão são os responsáveis pela maior parte da energia mundial produzida atualmente. Esses combustíveis são originados por meio de processos naturais que ocorrem ao longo de milhares de anos, como a decomposição de animais e vegetais que são depositados em camadas profundas da crosta terrestre ou do fundo do mar. Essas fontes de energia não são renováveis, ou seja, se encontram em quantidades limitadas na natureza e podem ter suas reservas esgotadas ao longo de sua utilização (Bhattarai et al., 2011). Entretanto, os impactos negativos causados pelo uso dos combustíveis fósseis vão muito além da possível extinção desse recurso na natureza: o meio ambiente sofre diretamente com o uso indiscriminado dessa fonte de energia e as consequências têm sido drásticas. A produção e o uso desses combustíveis resultam no aumento da emissão de gases que provocam o efeito estufa, intensificando o aquecimento global e provocando mudanças significativas no clima do planeta. Ao mesmo tempo, derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são recorrentes e também contribuem para a busca de soluções energéticas alternativas (Head e Gray, 2016). Diante desse quadro, os biocombustíveis têm sido alvo de atenção crescente nos últimos anos.

No Brasil, o principal biocombustível consumido é o etanol com uma produção de quase 30 milhões de metros cúbicos somente no ano de 2016, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (2016). O investimento em tecnologias para alavancar a produção de etanol teve início na década de 1970 quando o país passou pela crise mundial do petróleo, fato que motivou a criação de programas de estímulo à produção desse biocombustível, como o Proálcool. Desde então, o Brasil tornou-se um importante produtor do etanol de primeira geração (Cruz et al., 2012). Este, por sua vez, pode ser produzido a partir de diversas plantas cultivadas como trigo, beterraba, milho e mandioca, sendo que o rendimento mais vantajoso é oriundo da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar (Raízen, 2018).

O uso do etanol como combustível é cercado de inúmeras vantagens. Além de diminuir a dependência externa do petróleo, ele é considerado um combustível limpo e sustentável, uma vez que a sua produção e queima reduzem

significativamente a emissão de gás carbônico e, conseqüentemente, contribuem para a minimização do efeito estufa. Contudo, um impasse que vem sendo debatido mundialmente é o fato de que o terreno utilizado para produzir a matéria-prima do etanol é o mesmo empregado no plantio de alimentos. Desse modo, tem-se investido cada vez mais em novas tecnologias que aperfeiçoem a produção deste biocombustível sem que haja competição com as terras destinadas à produção alimentícia (Pacheco, 2011; Paulova et al., 2015). Nesse sentido, o desenvolvimento do etanol de segunda geração (2G), ou bioetanol, tem recebido atenção crescente de ambientalistas e economistas.

O bioetanol é um biocombustível produzido a partir da biomassa lignocelulósica. A sua produção envolve o aproveitamento total do açúcar da planta e não apenas do caldo. Resíduos agrícolas e florestais que são normalmente descartados podem ser utilizados como matérias-primas para obtenção de bioetanol, como é o caso do bagaço e palha de cana-de-açúcar, espigas de milho, farelo e casca de arroz, casca de coco, resíduos urbanos dentre outros (Menezes e Barreto, 2015). No entanto, a disponibilização de açúcares para produção do bioetanol só é possível através de processos químicos ou enzimáticos, o que torna o processo mais dispendioso que a produção do etanol de primeira geração (Gusakov, 2011).

A utilização de enzimas na hidrólise da biomassa tem sido fortemente investigada uma vez que elas oferecem diversos benefícios quando comparadas à hidrólise ácida. Dentre eles, inclui-se uma maior conversão da holocelulose em açúcares fermentescíveis, a formação reduzida de subprodutos que podem trazer prejuízos na etapa de fermentação e uma potencial redução de custos a médio/longo prazo (Leu e Zhu, 2012). Todavia, o alto custo dessas enzimas é hoje um dos maiores desafios na produção do bioetanol, incentivando assim a busca por fontes mais acessíveis das mesmas. Neste ponto, os microrganismos lignocelulolíticos entram como agentes importantes de transformação de biomassa em insumos energéticos (Saini et al., 2014).

O fungo filamentosso *Trichoderma reesei* está entre as linhagens microbianas mais bem estudadas em relação à degradação da celulose e por isso é considerado um organismo modelo para tais estudos (Sarkar et al., 2012). Esse fungo produz, em grandes quantidades, um conjunto completo de celulasas extracelulares que atuam na degradação do polímero de celulose (Gupta et al., 2016). Recentemente, muitos

esforços têm sido feitos a respeito da modificação genética desse microrganismo com o objetivo de otimizar a produção e secreção das enzimas celulolíticas. Tais modificações consistem na remoção de características genéticas não desejáveis e incorporação de características que permitam redução do número de etapas do processo de conversão, redução de custos, aumento do rendimento e consequentemente aumento da competitividade do bioetanol (Barros e Jardine, 2017). Nesta perspectiva, o sequenciamento do genoma de *T. reesei* por Martinez e colaboradores, em 2008 (Martinez et al., 2008), abriu portas para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na síntese e regulação das enzimas celulolíticas.

O sinergismo existente entre as celulasas para degradar o polímero de celulose é um processo complexo que exige o recrutamento de inúmeras proteínas com funções regulatórias. Muitas delas são, entretanto, fatores de transcrição ainda não estudados ou cuja função não foi completamente descrita (Antoniêto et al., 2014; Campos Antoniêto et al., 2016; dos Santos Castro et al., 2016; dos Santos Castro et al., 2014; Hakkinen et al., 2014). Nesse contexto, a identificação e caracterização de novos reguladores do processo de desconstrução da biomassa são de grande importância, considerando que a manipulação genética de tais genes pode originar linhagens mais potentes em relação à produção de celulasas e, consequentemente, aprimorar a produção do etanol de segunda geração. Nesse trabalho, nós identificamos e caracterizamos um novo fator de transcrição, homólogo ao Azf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na regulação do processo de degradação da biomassa em *T. reesei*. Essa proteína pode, em condições específicas, regular positivamente a expressão de genes que atuam na hidrólise da celulose. Os resultados aqui obtidos contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de regulação da expressão gênica em *T. reesei*, intensificando a aplicação desse fungo na indústria biotecnológica.

Levantamento teórico

II) LEVANTAMENTO TEÓRICO

II. 1) A biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é o principal componente estrutural das plantas e o composto orgânico mais abundante da biosfera, participando de aproximadamente 50% da biomassa terrestre (Pereira et al., 2008). Sua composição precisa é altamente complexa e varia de acordo com a espécie vegetal, tipo de tecido, estação do ano e localização geográfica (Benocci et al., 2017). O termo biomassa lignocelulósica está relacionado à parede celular da planta, que é composta por estruturas organizadas e fibrosas. Consiste em três componentes principais: a celulose, hemicelulose e lignina, que representam, respectivamente, cerca de 40 a 50%, 15 a 25% e 20 a 25% do peso seco da planta, sendo que os 5 a 10% restantes são representados por outros componentes (Lange, 2007; Zeng et al., 2017). A estrutura da lignocelulose pode ser observada na Figura 1.

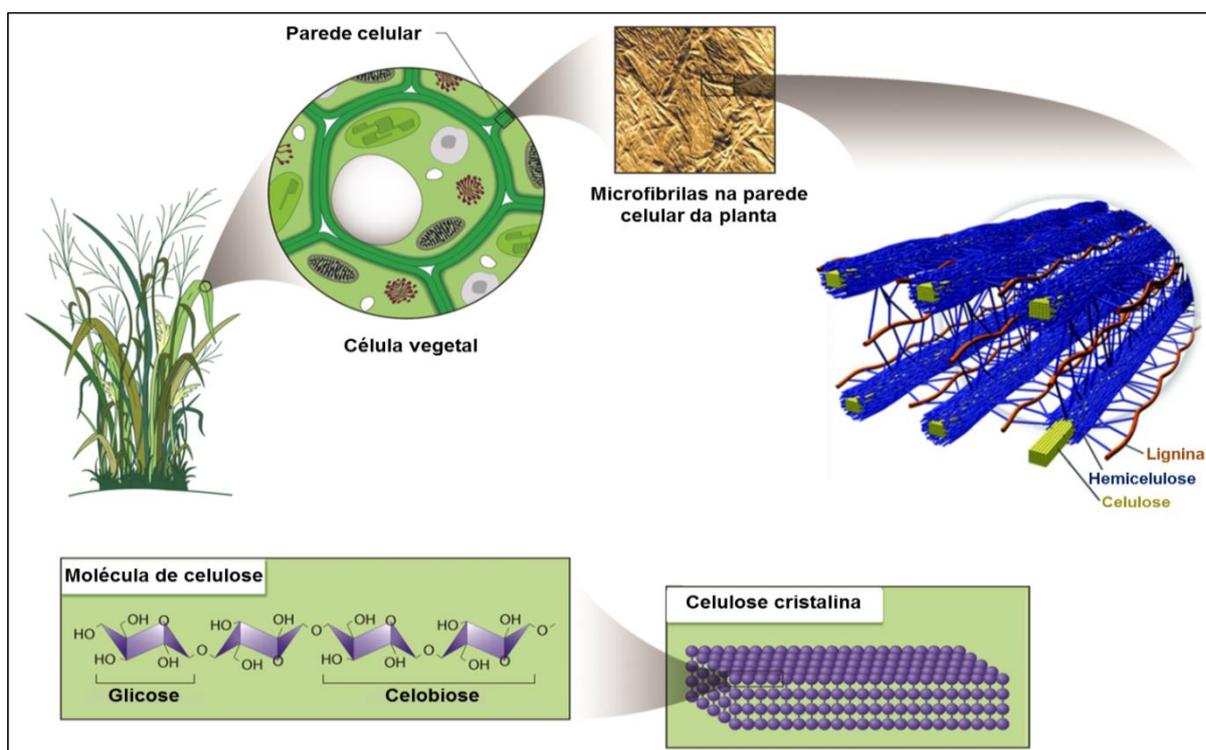


Figura 1. Estrutura da lignocelulose. O principal componente da lignocelulose é a celulose, um polissacarídeo formado por unidades repetidas de glicose unidas através de ligações $\beta(1,4)$. A hemicelulose, segundo componente mais abundante da lignocelulose, é composta por açúcares de 5 e 6 carbonos como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é constituída de três componentes fenólicos principais denominados álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Juntas, essas três estruturas formam as microfibrilas, que estão organizadas em macrofibrilas que garantem a estabilidade estrutural da parede celular vegetal (Adaptação de *Genome Management Information System*, 2005).

Celulose e hemicelulose, conjuntamente denominadas holocelulose, são polissacarídeos que estão associados a uma estrutura macromolecular que contém substâncias aromáticas, a lignina, que tem como função aumentar a resistência da estrutura da parede celular da planta a ataques químicos e enzimáticos (Pereira et al., 2008).

II. 1. 1) Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da natureza encontrado na parede celular das células vegetais, particularmente em troncos, galhos em todas as partes lenhosas da planta. Todo ano, aproximadamente 10^{15} toneladas de celulose são sintetizadas e degradadas no planeta (Berg et al., 2014; Nelson e Cox, 2014).

Estruturalmente, é um polímero fibroso, resistente e insolúvel em água. A rigidez conferida à celulose se dá pelo fato de que sua composição química é composta por cadeias lineares de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1,4)$, sendo o dissacarídeo celobiose a menor unidade de repetição da celulose que pode ser convertida em resíduos de glicose (Nelson e Cox, 2014). O homopolissacarídeo formado é linear e não ramificado. As microfibrilas de celulose são compostas por cerca de 30 a 36 cadeias de glicose agregadas lateralmente por meio de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. O tamanho exato dessas microfibrilas é desconhecido, mas observou-se que cadeias contendo até 14000 unidades de glicose podem alcançar um comprimento de cerca de 7 μm (Arantes e Saddler, 2010; Jarvis, 2017; Somerville et al., 2004).

Estudos baseados em diferentes métodos físicos e químicos mostram que as microfibrilas não são completamente cristalinas, apresentando, na verdade, duas regiões distintas. A primeira delas consiste em moléculas de celulose altamente ordenadas, e por isso é chamada de região cristalina. A outra parte, chamada de região amorfa ou paracristalina, é constituída por moléculas de celulose menos ordenadas. As regiões amorfas são mais suscetíveis à hidrólise devido a sua maior área superficial e facilidade de penetração das moléculas de água no interior das fibras. Juntas, essas duas regiões formam uma estrutura altamente aderente que confere as fibras de celulose um caráter hidrofóbico e uma força excepcional (Berg et al., 2014; Hon, 1994).

II. 1. 2) Hemicelulose

A hemicelulose constitui aproximadamente um terço da parede celular das plantas e, diferente da celulose, esta classe de polissacarídeos apresenta um significativo grau de ramificação que os tornam amorfos e principalmente solúveis água. A estrutura do esqueleto principal da hemicelulose é composta por um tipo específico de resíduo tal como a D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico. Esses monossacarídeos estão unidos através de ligações do tipo $\beta(1,4)$ e a partir do esqueleto principal, surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos (Farinas, 2011). Devido à sua heterogeneidade e complexidade, as hemiceluloses são frequentemente tratadas como uma entidade única (Sorieul et al., 2016).

As hemiceluloses são geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal do esqueleto como, por exemplo, xilanas, glucanas e mananas. De acordo com a espécie da planta, tipo de tecido e estágio de desenvolvimento, várias subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, incluindo glucuronoxilanas, xiloglucanas, arabinoxilanas, glicomananas, mananas lineares galactomananas, galactoglicomananas e β -glucanas (Ogeda e Petri, 2010). Na parede primária de dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas, a xilana é a hemicelulose mais abundante, podendo representar até 20% do peso seco da parede celular (Sandgren et al., 2005). As cadeias individuais das xilanas são mais curtas que as da celulose e seu esqueleto principal é composto por unidades de D-xilopiranoses (xilose) unidas por ligações $\beta(1,4)$. Além da xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido glicurônico ou seu éter 4-O-metílico, e os ácidos acético, ferúlico e p-coumarílico (Naidu et al., 2018; Saha, 2003) A estrutura diversificada da hemicelulose permite que esses polissacarídeos interajam entre si e com as microfibrilas de celulose através de ligações de hidrogênio. Além disso, há evidências de que a hemicelulose possa ser ligada covalentemente à lignina e a outros polissacarídeos como a pectina (Pauly et al., 2013).

II. 1. 3) Lignina

A lignina é o polímero aromático mais abundante na natureza. É encontrado na maioria das plantas terrestres e seu depósito na parede celular ocorre durante o crescimento da parede secundária da planta (Sandgren et al., 2005). A lignina

compõe aproximadamente 15 a 40% de peso seco da biomassa e tem como função proporcionar a integridade estrutural da parede celular (Ragauskas et al., 2014). Outro importante papel da lignina nas plantas inclui a defesa contra estresses bióticos e abióticos, especialmente agentes patogênicos e insetos, além de conferir estabilidade aos vasos do xilema para o transporte eficiente de água (Frei, 2013).

A estrutura complexa da lignina se forma através da polimerização de três monômeros fenólicos cuja abundância relativa é variável entre as espécies vegetais: álcool p-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Pereira et al., 2008). Devido à sua natureza aromática e à rede de polímeros altamente ramificada, a lignina é bastante inerte à degradação (de Gonzalo et al., 2016; M. Abdel-Hamid et al., 2013).

Um dos fatores que elevam o custo da produção do etanol lignocelulósico é a dificuldade de liberação dos monossacarídeos durante a ação das celulases e hemicelulases na parede celular e isso ocorre devido ao atrelamento da lignina à holocelulose, tornando-a resistente a hidrólise enzimática. A fim de facilitar esse processo, diversos pré-tratamentos mecânicos, térmicos e químicos tem sido desenvolvidos para romper a estrutura da parede vegetal, tornando o material lignocelulósico mais acessível à ação das enzimas holocelulolíticas (Vanholme et al., 2012).

II. 2) O gênero *Trichoderma*

Trichoderma spp. compreende fungos filamentosos presentes com maior frequência em regiões de clima temperado e tropical (Machado et al., 2012). Apresentam um crescimento rápido, conídios esverdeados e hifas ramificadas (Schuster e Schmoll, 2010). Diferentes substratos servem como habitats para o desenvolvimento desses fungos como o solo, madeira em decomposição, cogumelos comestíveis e até mesmo plantas, para algumas espécies endofíticas (Montoya et al., 2016). Mesmo em condições diversas, eles são capazes de se adaptar ao ambiente por meio de regulação do crescimento, conidação e produção de enzimas e, portanto, são alvos interessantes a serem explorados (Schuster e Schmoll, 2010).

O gênero *Trichoderma* é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e

biotecnológico (Samuels, 1996). Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma*, *T. reesei* é considerado o principal produtor de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal, enquanto *T. virens* e *T. atroviride* são agentes de controle biológico contra fitopatógenos. Esses dois últimos destacam-se como uma alternativa aos pesticidas sintéticos que podem ser prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (Druzhinina e Kubicek, 2005; Schmoll et al., 2016). O interesse econômico em *Trichoderma* spp. levou ao isolamento desses fungos de fontes inesperadas tais como baratas, mexilhões e mariscos (Schuster e Schmoll, 2010). Além das espécies já citadas, *T. longibrachiatum* também se tornou conhecida por ser um patógeno oportunista de mamíferos, incluindo seres humanos imunocomprometidos (Druzhinina e Kubicek, 2005).

A espécie *T. reesei* possui o menor genoma dentro do gênero *Trichoderma*. Interessantemente, apesar de sua alta eficiência na degradação da parede celular vegetal, o genoma de *T. reesei* contém o menor número de celulases entre os ascomicetos mais comumente estudados (Schmoll et al., 2016). A Figura 2 traz uma comparação entre o genoma de *T. reesei* com o de outras espécies bem estudadas quanto à degradação da biomassa (*Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Penicillium chrysogenum*), e a levedura *S. cerevisiae*.

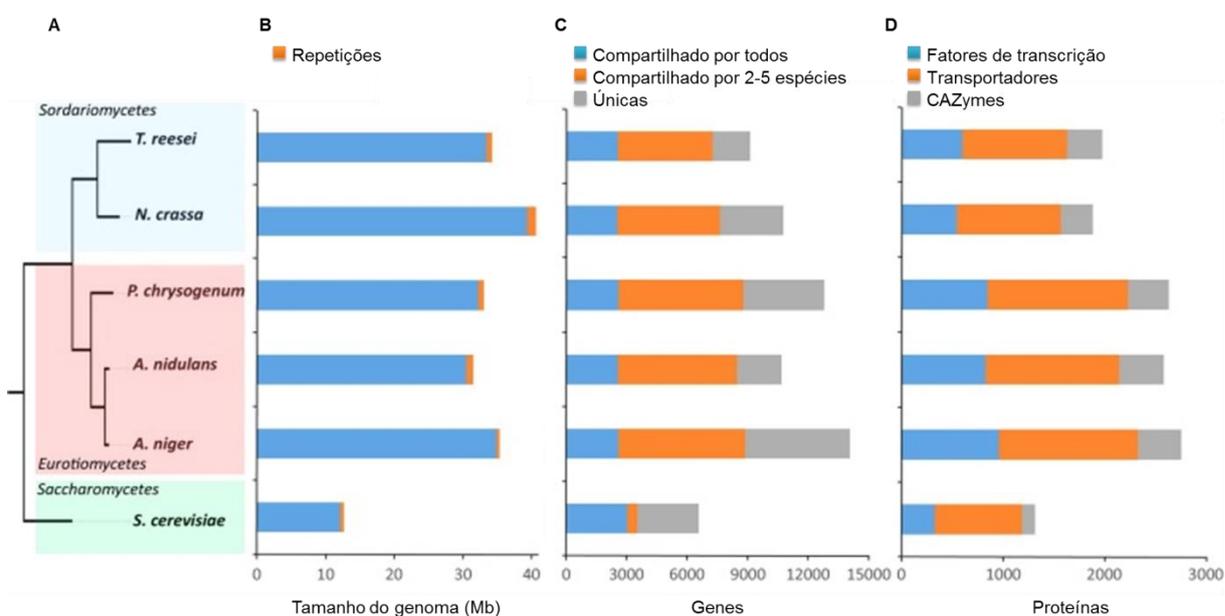


Figura 2. Comparação entre as principais características do genoma de *T. reesei* com as outras quatro espécies mais bem estudadas quanto à degradação de biomassa e *S. cerevisiae*. A) Análise filogenética entre as seis espécies analisadas. B) Tamanho do genoma. C) Conteúdo gênico. D) Proporção de fatores de transcrição, transportadores e CAZymes (Adaptação de Gupta et al., 2016).

Observa-se que essas espécies possuem uma similaridade em relação ao tamanho do genoma (com exceção de *N. crassa*, cujo genoma é maior (>40 Mb)). A maioria das proteínas produzidas é compartilhada por pelo menos duas dessas espécies, sendo que *T. reesei* é a que possui menor número de proteínas únicas. Além disso, essas espécies aparentam ter a mesma proporção de fatores de transcrição, transportadores e CAZymes (*Carbohydrate Active Enzymes*), independente do tamanho do proteoma (Gupta et al., 2016).

T. reesei foi identificado pela primeira vez durante a Segunda Guerra Mundial, devido à deterioração de tecidos de algodão pertencentes ao exército dos Estados Unidos nas Ilhas Salomão, onde foi isolado (Peterson e Nevalainen, 2012; Seiboth et al., 2011). Tempos depois, verificou-se que o fungo assexuado *T. reesei* era indistinguível da espécie sexuada *Hypocrea jecorina*, indicando que eles pertencem à mesma espécie. Assim, inicialmente classificados como gêneros diferentes, *T. reesei* e *H. jecorina* são manifestações de um mesmo organismo. De acordo com uma decisão tomada no Congresso Internacional de Botânica em julho de 2011, que entrou em vigor em 1 de janeiro de 2013, agora exige-se o uso de um único nome, no caso *Trichoderma*, baseado na predominância em publicações e voto da comunidade científica (Schmoll et al., 2016; Seiboth et al., 2011).

Dentro do gênero *Trichoderma*, as pesquisas em torno das enzimas holocelulolíticas aplicáveis na produção de bioetanol têm sido direcionadas principalmente ao *T. reesei*. Essa espécie é ainda utilizada em outros ramos da indústria incluindo papel e celulose, tratamentos têxteis e processamento de alimentos para animais (Aro et al., 2001).

II. 3) O sistema celulolítico de *T. reesei*

O fungo *T. reesei* produz um conjunto de enzimas que atuam de modo sinérgico para hidrolisar a celulose cristalina a oligossacarídeos menores e, finalmente, à glicose (Ilmen et al., 1997). De acordo com as suas estruturas, as enzimas do complexo celulolítico são agrupadas entre várias famílias de glicosil hidrolases (GHs) que estão depositadas no banco de dados das CAZymes (Hakkinen et al., 2012). Em relação ao local em que atuam, é possível classificar essas enzimas em pelo menos três grandes grupos: as endoglicanases (EG), que clivam as ligações internas da fibra de celulose; as exoglicanases (CBH), que atuam

na região externa da celulose; e as β -glicosidases (BG), que hidrolisam celobiose e outros oligossacarídeos solúveis em moléculas de glicose (Esterbauer et al., 1991). A Tabela 1 trás a relação completa das celulases produzidas por *T. reesei* com suas respectivas classificações.

Tabela 1. Enzimas celulolíticas de *T. reesei*. Adaptação de Druzhinina e Kubicek, 2017.

Enzima	Família	Nomeclatura atual ^a	Nomeclatura anterior	Identificação ^b
Celobiohidrolases	GH6	Cel6a	CBHII	Trire2:72567
	GH7	Cel7a	CBHI	Trire2:123989
Endoglicanases	GH5	Cel5a	EGII	Trire2:120312
	GH5	NN		Trire2:53731
	GH5	NN		Trire2:82616
	GH7	Cel7b	EGI	Trire2:122081
	GH12	Cel12a	EGIII	Trire2:123232
	GH12	NN		Trire2:77284
	GH45	Cel45a	EGV	Trire2:49976
β -glicosidases	GH3	Cel3a	BGI	Trire2:76672
	GH3	Cel3b		Trire2:121735
	GH3	Cel3c		Trire2:82227
	GH3	Cel3e		Trire2:76227
	GH3	Cel3f		Trire2:104797
	GH3	Cel3h		Trire2:108671
	GH3	Cel3j		Trire2:66832

^aNN, nome específico ainda não definido.

^bDe acordo com o banco de dados do genoma de *T. reesei* (<http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>).

As celulases produzidas por *T. reesei* pertencem a cinco famílias de GHs: as endo- β -1,4-D-glicanases são encontradas nas famílias GH5, GH7, GH12 e GH45 e GH3, as exoglicanases nas famílias GH6 e GH7 e as β -glicosidases na família 3. GH7 é a única família que contém tanto CBHs (CBH1/Cel7a) quanto endo- β -1,4-D-glicanases (EGI/Cel7b) (Druzhinina e Kubicek, 2017). Cel7a é a enzima dominante do complexo celulolítico, compreendendo cerca de 60% do total de proteínas secretadas por *T. reesei*. Em seguida, aparecem a Cel6a (20%) e as endoglicanases, em sua maioria Cel7b (10%). Em menor quantidade, as β -glicosidases representam apenas 1% das proteínas totais secretadas por essa espécie (Brady et al., 2015; Strakowska et al., 2014).

As endoglicanases (EC 3.2.1.4) clivam as ligações glicosídicas internas da celulose de modo aleatório, liberando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, novas cadeias finais. Endoglicanases fúngicas possuem, em sua maioria, pH ótimo entre 4,0 e 5,0 e temperatura ótima na faixa de 50 e 70 °C, e apresentam-se geralmente como monômeros com pouca ou nenhuma glicosilação (Dashtban et al., 2009; Kubicek et al., 2009). As principais endoglicanases de *T. reesei* são as EGI e EGIII. A endoglicanase III (EGI/Cel7b) de *T. reesei* pertence à família de proteínas GH7. Tem um peso molecular de 54 kDa e um ponto isoelétrico (PI) de 4,7. Contém em torno de 4% de carboidratos, dos quais 70% estão ligados à proteína por ligações O-glicosídicas. A endoglicanase III (EGIII/Cel12a) é classificada como membro da família GH12. Em *T. reesei*, a massa molecular desta enzima é de 25 kDa, é composta por 234 aminoácidos e possui um PI de 4,8 (Strakowska et al., 2014).

As exoglicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) hidrolisam preferencialmente as ligações β -1,4-glicosídicas das extremidades da cadeia de celulose, produzindo como produto principal a celobiose. As CBHs, assim como as endoglicanases, são monômeros com pouca ou nenhuma glicosilação. Atuam em uma faixa de pH ótimo que varia entre 4,0 e 5,0 e temperatura ótima entre 37 e 60 °C. Em *T. reesei* foram identificadas duas diferentes celobiohidrolases. Uma delas, denominada CBHII/Cel6a, atua a partir da extremidade não-redutora e a outra, CBHI/Cel7a, na extremidade redutora da celulose, resultando em uma degradação celulolítica bastante eficiente (Dashtban et al., 2009; Pereira et al., 2008). A Cel7a de *T. reesei* é uma glicoproteína com um peso molecular de 65 kDa, embora algumas fontes afirmem que o peso molecular pode variar entre 59 a 68 kDa. Essa proteína possui 496 aminoácidos, é composta por 10% de carboidratos e seu PI é de 4,4. A Cel6a tem um peso molecular entre 50–58 kDa e um PI de 5,0, além de conter 8% de carboidratos em sua estrutura (Strakowska et al., 2014). As exoglicanases geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, que atua como um inibidor competitivo, limitando a capacidade das enzimas em degradar todas as moléculas de celulose de um sistema (Dashtban et al., 2009; Pereira et al., 2008).

Por fim, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Essas enzimas possuem um peso molecular

entre 73–150 kDa (Strakowska et al., 2014). As BGs não agem diretamente sobre a cadeia de celulose. Elas desempenham um papel muito importante na regulação da atividade de outros componentes do complexo celulolítico porque evitam o acúmulo de celobiose. Dessa forma, quando a atividade das β -glicosidases está em baixa, pode haver um acúmulo desse dissacarídeo, que é um inibidor da atividade das celobiohidrolases e endoglucanases (Sipos et al., 2009). As β -glicosidases também convertem o dissacarídeo celobiose em sofrorose, através de um fenômeno denominado transglicosilação (Elgogary et al., 1989; Saloheimo et al., 2002a).

Mais recentemente, foi descrito outro grupo de proteínas muito expresso em fungos e relacionado ao processo de conversão da biomassa, as glicosil hidrolases da família 61 (GH61/AA9s), recém renomeadas LPMOs. A relação dessas enzimas com a degradação de celulose foi descrita recentemente e tem sido sugerido que elas atuam diretamente sobre a celulose através de um mecanismo oxidativo, tornando-a mais acessível à ação das celulases tradicionais (Quinlan et al., 2011). Além das GH61, uma proteína conhecida como *swollenin* também participa da desconstrução da parede celular vegetal. A sequência gênica que codifica a *swollenin* em fungos assemelha-se as expansinas vegetais, e ambas tem como função o rompimento das pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose sem hidrolisá-las, aumentando a hidrólise da biomassa (Saloheimo et al., 2002b). O mecanismo de atuação desse conjunto de enzimas pode ser observado na Figura 3.

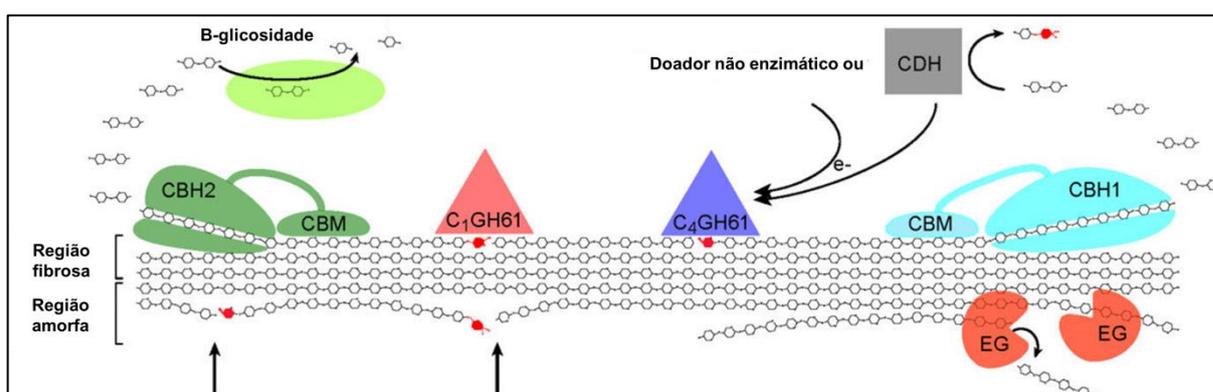


Figura 3. Modelo enzimático de degradação da celulose. Inicialmente, as endoglucanases (EG) e celobiohidrolases (CBH) degradam a celulose em oligossacarídeos mais simples, principalmente celobiose. Em seguida, as β -glicosidases hidrolisam a celobiose, originando moléculas de glicose. A enzima GH61 participa desse processo através da degradação oxidativa da celulose. Em conjunto, essas proteínas proporcionam a desconstrução da biomassa vegetal (Adaptação de Horn et al., 2012).

Isoladamente, as enzimas do complexo celulolítico não hidrolisam a celulose de maneira eficiente. Sendo assim, é necessário que haja um sinergismo, ou seja, uma ação em conjunto para que o rendimento das celulasas quando atuam em conjunto seja melhor do que a soma de seus rendimentos individuais (Pereira et al., 2008). São conhecidas pelo menos três formas de sinergia: sinergia endo-exo, em que as endoglicanases atuam nas regiões amorfas da celulose, liberando terminais redutores e não redutores, que sofrem ação das CBHs do tipo I e do tipo II, respectivamente; sinergia exo-exo, em que as duas celobiohidrolases atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores liberados pela ação das endoglicanases; e a sinergia exo-BG e endo-BG, em que as exoglicanases e endoglicanases liberam celobiose e oligossacarídeos, que servem como substratos para as β -glicosidases (Lynd et al., 2002).

Sabe-se que a celulose sozinha é incapaz de desencadear o processo de indução, uma vez que é um polissacarídeo insolúvel e não pode atravessar a membrana celular. Dessa forma, *T. reesei* precisa “sentir” a presença do polissacarídeo insolúvel fora da célula para desencadear a maquinaria celulolítica. Embora a identidade do verdadeiro "indutor" continue sendo especulativa, diversas linhas de evidências foram apresentadas pela comunidade científica sugerindo que os oligossacarídeos solúveis liberados da celulose ou seus derivados podem ser as moléculas que realmente desencadeiam a indução as enzimas celulolíticas (Kubicek et al., 1993a). Especificamente, a celobiose, principal dissacarídeo resultante da degradação da celulose, e a soforose, um derivado resultante da transglicosilação da celobiose, mostram-se indutores da expressão gênica e atividade celulolítica em *T. reesei* (Kubicek et al., 1993b). Além disso, a presença de um sistema de captação de celobiose foi encontrada em *T. reesei*. Embora a identidade da celobiose permease de *T. reesei* e seu papel na indução celulolítica ainda não estejam bem elucidados, a deleção de um dos principais transportadores de açúcar da *Major Facilitator Superfamily* (MFS) em *Neurospora crassa* parece comprometer o crescimento desse fungo em celobiose e celulose (Galazka et al., 2010), reforçando o papel da na regulação da expressão dos genes de celulasas (Zhang et al., 2013). Uma segunda hipótese ressalta que os conídios de *T. reesei* possuem atividade celulolítica em sua superfície. Dessa forma, as enzimas localizadas na superfície dos conídios são formadas independentemente das condições nutricionais usadas

para induzir a esporulação e são capazes de hidrolisar celulose cristalina (Kubicek et al., 1988). A última linha de raciocínio baseia-se no fato de que, após um período de 20 a 30 horas de cultivo em presença de glicose, transcritos de celulasas podem ser detectados no meio. Esse fenômeno sugere que um açúcar indutor pode ser derivado de carboidratos liberados pelo fungo durante condições de inanição (Ilmen et al., 1997). Os três modelos explicativos expostos acima não são, entretanto, essencialmente diferentes, apenas descrevem mecanismos operando em condições fisiológicas distintas, uma vez que todos levam a um caminho comum: a formação de indutores da produção de celulasas (Kubicek et al., 2009).

II. 4) Regulação transcricional dos genes de celulasas

Em *T. reesei*, a produção de enzimas celulolíticas é regulada a nível transcricional de acordo com a fonte de carbono presente no meio. A síntese dessas enzimas é iniciada somente quando o fungo precisa utilizar os polissacarídeos vegetais como fonte de energia (Shida et al., 2016). A regulação dos principais genes de celulasas ocorre de forma coordenada de acordo com a fonte de carbono disponível. A expressão desses genes pode ser induzida por celulose e outras substâncias (por exemplo, sofrorose e lactose), enquanto a glicose atua como uma fonte de carbono repressora. Embora a expressão dos genes de celulasas em resposta a fonte de carbono tenha sido extensivamente estudada, os mecanismos moleculares que regulam essa expressão ainda são pouco compreendidos (Furukawa et al., 2009; Nakari-Setälä et al., 2009).

Diferentes estudos sobre a rede de regulação da expressão de celulasas em *T. reesei* e em outros organismos vêm permitindo a identificação de diversas proteínas envolvidas nesse processo. Nove fatores de transcrição foram identificados, até o momento, como participantes do processo regulatório da expressão de celulasas no fungo *T. reesei*: os reguladores positivos XYR1, ACEII, ACEIII, LAE1, VELVET, BglR e o complexo de HAP2/3/5, bem como os repressores catabólicos ACEI e CRE1 (Gupta et al., 2016; Hakkinen et al., 2014; Portnoy et al., 2011a).

XYR1 é considerado o principal ativador de expressão dos genes de celulasas e hemicelulasas, uma vez que a supressão desse fator elimina a indução de celulase por todos os outros indutores, prejudicando também a indução de genes

de hemicelulases envolvidos na degradação de xilanas e arabinanas. Esse fator de transcrição é um ortólogo do gene *xlnR* de *A. niger*, o qual controla a transcrição de mais de 20 genes que codificam celulasas e hemicelulases (Furukawa et al., 2009; Portnoy et al., 2011b). A deleção do segundo regulador positivo, ACEII, provoca uma diminuição nos níveis de transcrição da maioria das celulasas e reduz consideravelmente a atividade celulolítica quando o fungo é cultivado em meio contendo celulose (Aro, 2001). Acredita-se que o complexo HAP2/3/5, terceiro regulador positivo, promove a formação de uma estrutura aberta de cromatina, necessária para a ativação do processo de transcrição (Zeilinger et al., 2003). O fator de transcrição ACEIII foi descoberto mais recentemente e sua deleção mostrou-se prejudicial à produção de celulasas e xilanases no fungo *T. reesei* (Hakkinen et al., 2014). Adicionalmente, o fator de transcrição BglR atua como um regulador positivo de genes específicos de β -glicosidases (Nitta et al., 2012). Por fim, a deleção do gene *vel1* diminui completamente a expressão de genes de celulasas, xilanases e de *xyr1* na presença de lactose. Da mesma forma, a deleção do gene *lae1* promove a repressão de genes de celulasas, proteínas acessórias, β -glicosidases e xilanases. Interessantemente, estes estudos demonstraram que ocorre uma ação combinada entre o complexo LAE1/VELVET para regulação do fator de transcrição XYR1 (Karimi Aghcheh et al., 2014; Seiboth et al., 2012).

Dentre os reguladores negativos da transcrição dos genes das celulasas, o principal fator de transcrição é o repressor catabólico CRE1, que reprime a expressão dos relacionados à degradação de celulose em presença de glicose. Além de CRE1, estudos têm demonstrado que ACEI reprime a expressão dos principais genes de celulasas (*cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2*) e xilanases (*xyn1* e *xyn2*), sob as condições indutoras celulose e soforose (Aro et al., 2003; Furukawa et al., 2009; Strauss et al., 1995). A Figura 4 mostra a atuação dos fatores de transcrição atuantes na regulação da produção de celulasas em *T. reesei*.

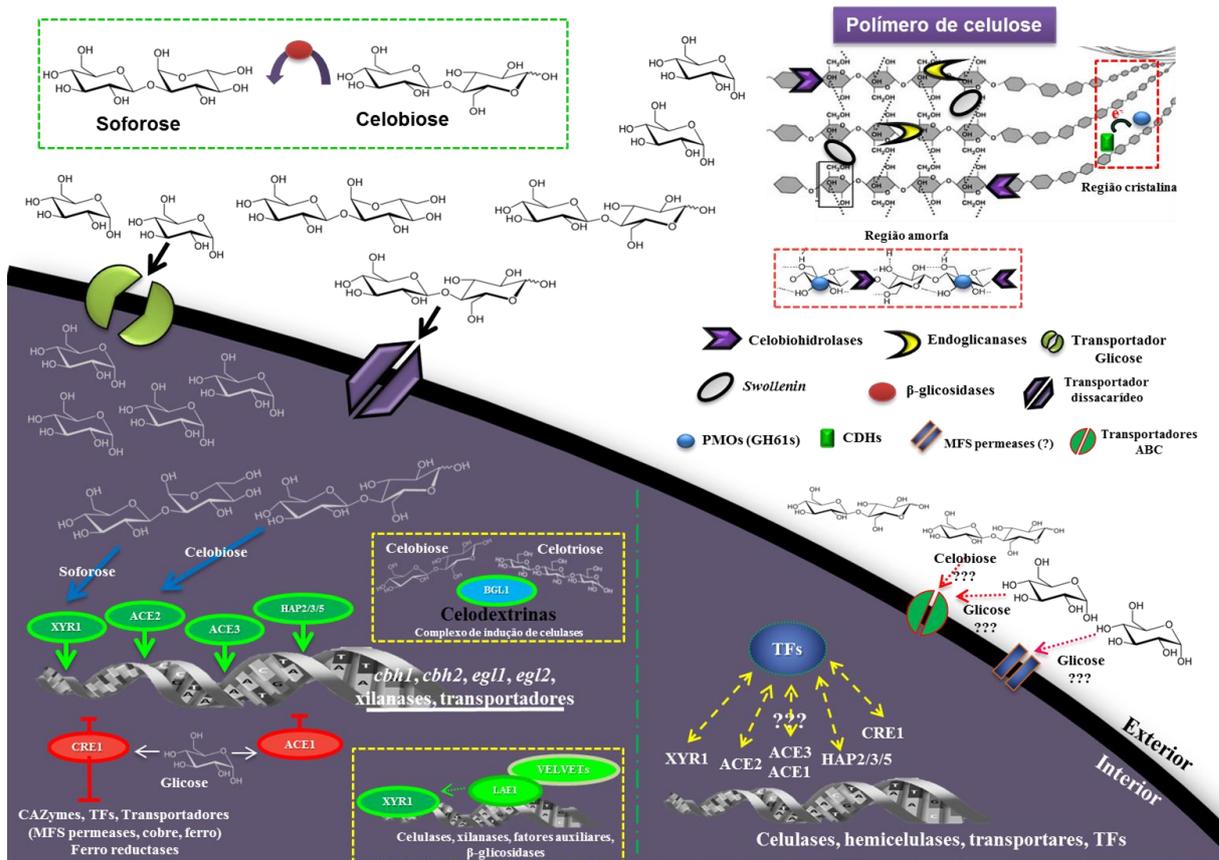


Figura 4. Visão global da regulação da expressão das celulases em *T. reesei*. A expressão dos genes celulolíticos é controlada pelos fatores de transcrição principais: XYR1, ACE1, ACE2, ACE3, CRE1 e o complexo HAP2/3/5. Além disso, a proteína LAE1, uma metiltransferase putativa, e VELVET mostraram-se importantes na expressão dos genes de celulases. Sob condições de glicose elevada, *T. reesei* não induz a expressão de celulases e o fator de transcrição CRE1 é o responsável por mediar o mecanismo de repressão catabólica de carbono. Além dos fatores de transcrição já conhecidos, novas proteínas regulatórias ainda não caracterizadas podem participar da ativação ou repressão, direta ou indireta, dos principais fatores de transcrição envolvidos com a expressão das celulases (Adaptação de Gupta et al., 2016).

Apesar dos inúmeros estudos acerca dos fatores de transcrição já identificados em *T. reesei*, diversas proteínas regulatórias envolvidas na regulação do processo de desconstrução da biomassa lignocelulósica ainda possuem funções desconhecidas. Em um trabalho publicado em 2014 (dos Santos Castro et al., 2014), sete genes que codificam fatores de transcrição tiveram sua expressão afetada durante o crescimento em celulose. Da mesma forma, dezoito genes também foram modulados em presença de sofrorose e glicose, sendo que a maioria deles ainda não tem uma função descrita. De modo similar, foram identificados quatorze fatores de transcrição em *T. reesei* cujas expressões foram alvo do mecanismo de repressão catabólica de carbono (CCR) mediado por CRE1 durante o cultivo em celulose e glicose (Antoniêto et al., 2014) e oito em sofrorose (Antoniêto et al., 2016). A maioria deles, entretanto, não possui função conhecida, o que ressalta a importância de se

explorar ainda mais a respeito das proteínas regulatórias envolvidas na degradação da biomassa.

Uma das maneiras de se manipular a expressão gênica das celulasas é através do uso da engenharia genética sobre os principais fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão dessas enzimas. Vários trabalhos retratam estratégias para manipulação desses reguladores de modo que se possa melhorar a produção das celulasas ou fazer com que os genes celulolíticos sejam expressos constitutivamente (Druzhinina e Kubicek, 2017; Lv et al., 2015; Mello-de-Sousa et al., 2016; Seiboth et al., 2012; Zou et al., 2012). Dentre essas estratégias encontra-se a deleção ou o truncamento de determinados fatores de transcrição que podem reprimir a expressão das celulasas, como o *cre1* e o *ace1* (Aro et al., 2003; Nakari-Setälä et al., 2009), ou a superexpressão de outros, como o *xyr1*, *ace3*, *lae1* e *vel1* (da Silva Delabona et al., 2017; Hakkinen et al., 2014; Karimi Aghcheh et al., 2014; Seiboth et al., 2012), tornando o nível de expressão dessas enzimas mais elevado.

Além das estratégias já citadas, a manipulação genética dos sítios de ligação desses fatores de transcrição no DNA é também uma alternativa utilizada para aumentar a expressão dos genes celulolíticos. Estudos mostram que a substituição dos sítios de ligação de CRE1 por sítios de ACEII e do complexo HAP2/3/5 na região promotora de *cbh1* é estratégia altamente eficiente para melhorar a força desse promotor (Zou et al., 2012). De modo similar, a deleção de sítios de ligação para CRE1 e a inserção de múltiplas cópias de sítios para reguladores positivos no promotor de *cbh1* não apenas eliminam o efeito de repressão da expressão de celulasas em presença de glicose, como também aumentam a atividade desse promotor e os níveis de produção de proteínas heterólogas em *T. reesei* (Liu et al., 2008). Tais relatos ressaltam a importância de se conhecer os fatores de transcrição envolvidos na regulação da degradação da biomassa e os mecanismos através dos quais esses reguladores interagem com os elementos de regulação presentes nas regiões promotoras dos genes envolvidos nesse processo.

II. 5) O fator de transcrição Azf1

Diante dos vários fatores de transcrição com funções desconhecidas possivelmente envolvidos na degradação da celulose, nosso grupo de pesquisa realizou uma análise de bioinformática utilizando dados de RNA-seq (Antoniêto et

al., 2014; Antoniêto et al., 2016; dos Santos Castro et al., 2016; dos Santos Castro et al., 2014) e chegou a um fator de transcrição de *T. reesei*, homólogo à proteína regulatória Azf1 de *S. cerevisiae*, que posteriormente mostrou ter um importante papel do mecanismo de regulação das enzimas celulolíticas.

Em *S. cerevisiae*, Azf1 é uma proteína do tipo dedo de zinco, do inglês *zinc finger* (ZF), rica em asparagina que deu origem ao nome Azf1, do inglês *Asparagine-rich Zinc Finger protein*. Azf1 foi inicialmente identificado como uma proteína supressora de uma mutação no gene da RNA polimerase mitocondrial RPO41 e o reconhecimento como sendo um fator de transcrição veio posteriormente, com base em seu domínio dedo de zinco e localização nuclear (Brohl et al., 1994; Stein et al., 1998).

Em 2002, Newcomb e colaboradores demonstraram que, em presença de glicose, Azf1 pode estar envolvido em mecanismo de crescimento e regulação do ciclo celular em *S. cerevisiae* (Newcomb et al., 2002). Nesse trabalho, foi demonstrado que Azf1 interage com a região promotora do gene que codifica a proteína CLN3, uma G1 ciclina, cuja expressão está diretamente relacionada à duração da fase G1 do ciclo celular: um aumento da expressão de CLN3 encurta G1, enquanto a diminuição de CLN3 prolonga G1. Sendo assim, a proteína Azf1 atua como um ativador transcricional dependente de glicose e a sua deleção acarreta em uma redução da indução de CLN3 em presença de glicose.

Outro estudo publicado por Slattery e colaboradores, em 2006, mostrou que as propriedades atribuídas ao fator de transcrição Azf1 e *S. cerevisiae* estão diretamente relacionadas às fontes de carbono disponíveis no meio de crescimento (Slattery et al., 2006). Assim sendo, foi observado através de estudos de microarranjo que, em glicose, Azf1 ativa principalmente genes relacionados ao metabolismo de carbono e metabolismo energético e em glicerol-lactato, os principais genes ativados por Azf1 estão envolvidos na manutenção da parede celular.

Em *T. reesei*, Azf1 é classificado como um fator de transcrição do tipo dedo de zinco. As proteínas de ligação ao zinco formam uma das maiores famílias de reguladores transcricionais em eucariotos, exibindo estruturas secundárias variadas e uma enorme diversidade funcional. São agrupadas juntas por possuírem pelo menos um motivo comum: o dedo de zinco (MacPherson et al., 2006).

O fator de transcrição Azf1 de *T. reesei* pertence à classe Cys₂His₂ (C₂H₂) dos ZFs. Um típico ZF C₂H₂ é um pequeno motivo proteico que apresenta dois resíduos de histidina e dois de cisteína que se ligam ao íon zinco. Esses domínios proteicos contêm aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos e formam estruturas secundárias com duas folhas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice (Figura 5). Cada ZF reconhece uma sequência de três ou quatro nucleotídeos (Iuchi, 2001; Razin et al., 2012).

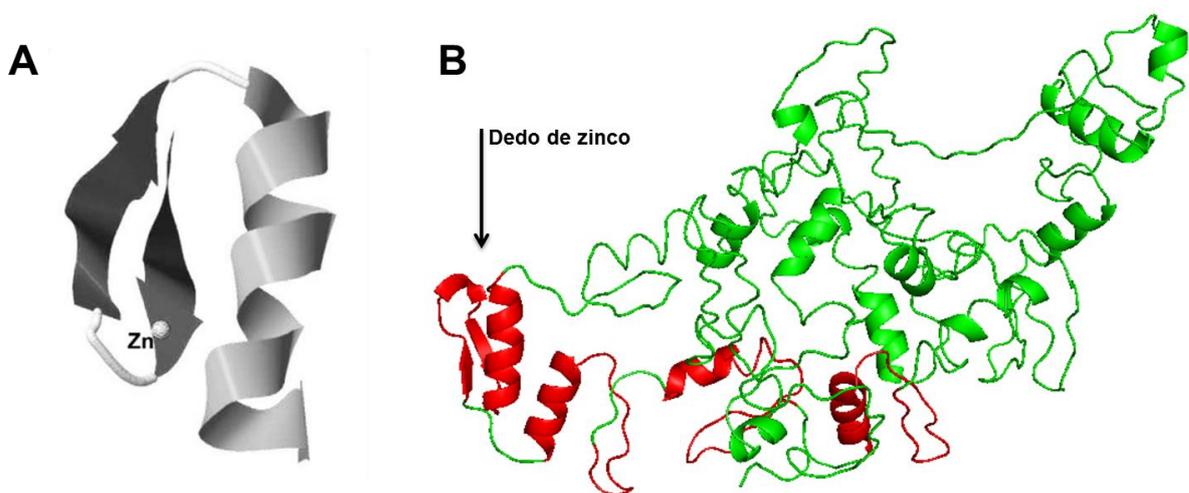


Figura 5. Estrutura de um motivo dedo de zinco do tipo C₂H₂. A) Esse motivo é caracterizado por formar estruturas secundárias com duas folhas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice. O íon zinco participa da estabilização da estrutura desse motivo (Adaptação de Razin et al., 2012). B) Predição da estrutura do Azf1 de *T. reesei*.

Em geral, o íon zinco estabiliza o domínio proteico e contribui para a manutenção correta da estrutura e função da proteína. A maioria dos ZFs se liga ao DNA (podendo também interagir com RNA e outras proteínas) e, assim, eles desempenham um papel importante nos processos de regulação da transcrição gênica (MacPherson et al., 2006).

Objetivos

III) OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de desconstrução da biomassa em *T. reesei* através da identificação de novos fatores de transcrição associados a esse processo. Dentre os objetivos específicos, pode-se citar:

- Identificação de fatores de transcrição de *T. reesei* potencialmente associados ao mecanismo de degradação da biomassa através de análises *in silico* de dados obtidos através de sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-seq).
- Análise do perfil de expressão gênica dos principais fatores de transcrição identificados *in silico* através de PCR em tempo real, após o crescimento de *T. reesei* em bagaço de cana e glicose.
- Deleção do gene de *T. reesei* Tr103275, homólogo do fator de transcrição Azf1 de *S. cerevisiae*, que se mostrou potencialmente envolvido na degradação da biomassa.
- Caracterização fenotípica e determinação do perfil de expressão dos genes celulolíticos no mutante $\Delta azf1$.
- Obtenção do motivo dedo de zinco de Azf1 recombinante através de expressão heteróloga em *Escherichia coli*.
- Análise da interação entre o fator de transcrição Azf1 e o motivo de ligação no DNA através da tecnologia de Ressonância Plasmônica de Superfície.

Metodologia

IV) METODOLOGIA

IV. 1) Identificação de fatores de transcrição de *T. reesei* potencialmente associados à degradação da biomassa através de análises *in silico*

Dados de RNA-seq produzidos no laboratório do Dr. Roberto do Nascimento Silva (FMRP-USP) foram utilizados para acessar o comportamento de expressão gênica do fungo *T. reesei* durante o crescimento em diferentes fontes de carbono (celulose, soforose e glicose). Os experimentos foram realizados na linhagem selvagem QM9414 e em mutantes para os genes *xyr1* e *cre1* (Antoniêto et al., 2014; Campos Antoniêto et al., 2016; dos Santos Castro et al., 2016; dos Santos Castro et al., 2014). Para a identificação de motivos de DNA potencialmente relacionados com a regulação desses genes, as regiões promotoras dos genes de interesse, representadas por sequências de 1,5 kb de DNA a jusante do códon de início dos mesmos, foram extraídas do genoma completo disponível no JGI homepage (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). As regiões promotoras foram analisadas com o auxílio do programa MEME e os motivos de DNA identificados foram analisados utilizando a ferramenta TOMTOM (Bailey et al., 2006). Os motivos obtidos foram comparados com aqueles depositados nas bases de dados de leveduras. Uma vez identificados elementos com semelhança àqueles previamente caracterizados em leveduras, os fatores transcricionais associados a estes foram utilizados para realizar a busca de genes homólogos em *T. reesei* através da ferramenta BLAST. As sequências dos genes selecionados foram então obtidas através do banco de dados do genoma de *T. reesei* disponível no JGI homepage.

IV. 2) Avaliação da expressão gênica dos 14 fatores de transcrição identificados pela análise *in silico*

IV. 2. 1) Manutenção e crescimento do fungo

Para avaliar a expressão gênica dos 14 fatores de transcrição identificados através da análise *in silico*, a linhagem de *T. reesei* QM9414 foi crescida em meio MEX a 28°C durante o período de sete dias, até a completa esporulação. Para os experimentos utilizando bagaço de cana como fonte de carbono, uma suspensão de 10⁶ esporos/mL (NaCl 0,8% (p/v); tween 80 0,05% (v/v)) da linhagem QM9414 de *T.*

reesei foi inoculada em Erlenmeyer de 1L contendo 200mL de meio Mandels-Andreotti (dos Santos Castro et al., 2014) contendo 1% (p/v) de glicerol. Após 24 horas, o micélio foi coletado, lavado com meio Mandels-Andreotti sem fonte de carbono e transferido para Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de meio Mandels-Andreotti com 1% (p/v) bagaço de cana. Os frascos foram incubados a 200 rpm, em agitador orbital, a 28°C por 24, 48, 72 e 96 horas. Para o crescimento em glicose, 10^6 esporos/mL de QM9414 foram inoculados em 200 mL de meio Mandels-Andreotti contendo 2% (p/v) de glicose. Os frascos foram incubados a 200 rpm, em agitador orbital, a 28°C por 24 e 48 horas. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra. Após a indução, os micélios foram coletados por filtração, congelados e estocados a -80°C.

IV. 2. 2) PCR em tempo real (qRT-PCR) para avaliação da expressão gênica dos 14 fatores de transcrição identificados

Os micélios de *T. reesei* foram macerados para extração do RNA total. Cada amostra teve seu RNA extraído utilizando-se o reagente da Life Technologies TRIzol[®] RNA, de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA, 1µg de RNA foi primeiramente tratado com DNaseI (Fermentas) para remoção de DNA genômico. Após essa etapa, fitas de cDNAs foram sintetizadas usando-se o kit Maxima[™] First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) de acordo com a instrução do fabricante. Os mesmos foram utilizados para análise por PCR em Tempo Real (qRT-PCR) no equipamento Bio-Rad CFX96[™], usando SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad) para o sinal de detecção, de acordo com as instruções do fabricante. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade total de cDNA presente em cada reação. O *software* Mev 4.8.1 foi utilizado para a construção do *heat map*. Os primers utilizados para amplificação dos genes identificados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação dos genes identificados na análise de bioinformática através de qRT-PCR.

Gene ID ^a	Primer foward	Primer reverse
103275	AGAATCTCACCATACGCCATG	CAATGCCCATGTGAAAGACG
120475	AGTTTTGGGAGCATCTGAGC	TTTGGGATGGTGAGGTTGG
38080	GTCTGAGCATTTCGTCCTATTCC	GTGCATGGAATTCGGAATCTG
27357	GCATCTCATATCCTGGTCATCG	ATCCGTACATGTTGAGCTGAC
47635	AATCCCATCAAGTTCGAGTCG	CCTCTACTCTGCGTCATGTTG
78688	CCAAGAGGAAACAGATACCCC	ATTCGTCTTCGTCCAGCAC
58897	CCTACATCGCCTACTTCCATC	GGGACGTGGACATATCAAAGG
75672	TCGGCAAACAAGAAACACAAG	AGATGGCTCTTGAGGTTGTG
112342	CAGTGGGACAATTTTCATGGC	GTTTCGACCAGTAAAGGGAGG
36543	AGAAGCCTGAGACGTTTCATG	AAGCGTCGAATGTACTGATCC
45866	TGTATCTTCAGCATTGTCCGG	GCTGTCTATCGTGTTCTGGG
27649	TGAGGTTGCCGATGACAAG	GGAGAGTAGGTCAGCTTGGAG
122767	CGTTTCCATACTTTGTCCAGC	GTTTTGCACACTCGTCATCG
3856	TGTTACCATGCCCCGATAC	CAAAGTTGCCTGTGAAGTGTG
Actina 44504	TGAGAGCGGTGGTATCCACG	GGTACCACCAGACATGACAATGTT

^aID, identificação de acordo com o banco de dados do genoma de *T. reesei* (<http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>).

IV. 3) Atividades enzimáticas e dosagem de glicose do QM9414 em bagaço de cana

IV. 3. 1) Atividade de CMCase

Para determinar a atividade de carboximetilcelulases (CMCase), a reação consistiu de 30 µL de carboximetilcelulose (CMC) 1% preparada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 e 30 µL de amostra (sobrenadante obtido a partir da coleta do micélio crescido em bagaço de cana nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas). A reação foi incubada a 50 °C por 30 minutos, seguida da adição de 60 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e posterior aquecimento a 95 °C por 5 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 540 nm pelo método de DNS. Para isso, foi utilizado o equipamento xMark™ Microplate Spectrophotometer da Bio-Rad. Uma unidade de enzima foi definida como a

quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto (Castro et al., 2014).

IV. 3. 2) Atividade de FPase

Para determinar a atividade de celulase total (FPase), foi empregada uma pequena tira de papel de filtro Whatman nº1 (50 mg), 30 μL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 30 μL de amostra (sobrenadante obtido a partir da coleta do micélio crescido em bagaço de cana nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas). Essa reação foi incubada a 50 °C por 30 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 60 μL de DNS com aquecimento a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, para determinação da concentração de açúcar redutor, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm, no equipamento xMark™ Microplate Spectrophotometer da Bio-Rad. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto (Castro et al., 2014).

IV. 3. 3) Dosagem de glicose

Para determinar a quantidade de glicose presente no sobrenadante das amostras crescidas em bagaço de cana por 24, 48, 72 e 96 horas, foi utilizado o kit Glicose Liquiform (Labtest Diagnóstica), segundo as instruções do fabricante.

IV. 4) Análise filogenética

As sequências da proteína Azf1 de *T. reesei* e outras espécies utilizadas na construção da árvore filogenética foram obtidas a partir do JGI *Genome Portal* (<http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>) e do banco de dados de proteínas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), respectivamente. O alinhamento múltiplo de sequência foi realizado pelo ClustalW e as árvores do tipo *neighbour-joining* foram criadas pelo programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) com 1000 *bootstraps*.

IV. 5) Deleção do fator de transcrição Azf1 de *T. reesei*

A metodologia utilizada para obtenção da linhagem mutante, cujo gene Tr103275 (homólogo do Azf1 de *S. cerevisiae*) foi deletado de *T. reesei*, foi realizada

de acordo com Schuster e colaboradores (Schuster et al., 2012), no qual o cassete de deleção é obtido por recombinação homóloga em levedura. O marcador de seleção utilizado foi o gene de resistência à higromicina (*hph* - *E. coli hygromycin B phosphotransferase*). A linhagem de *T. reesei* utilizada para deleção do gene Tr103275 foi a TU6_Δ*tku70*, que possui auxotrofia a uridina e deficiência para recombinação não homóloga, favorecendo assim a estratégia de recombinação homóloga utilizada nesse estudo. Um esquema resumido da estratégia de recombinação homóloga em levedura pode ser observado na Figura 6.

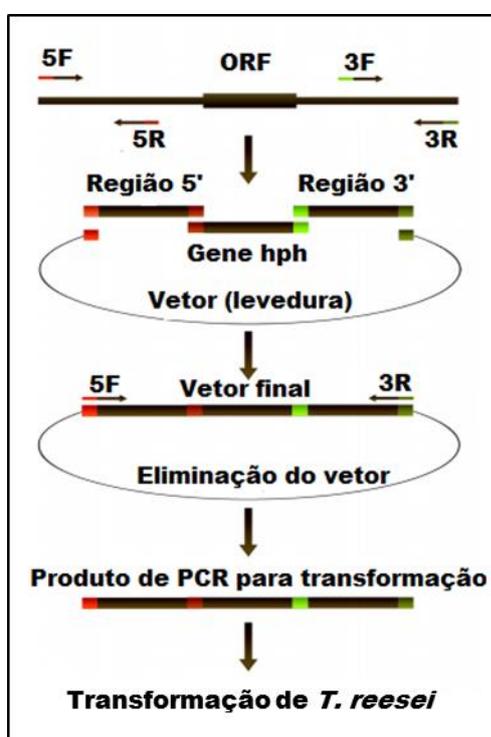


Figura 6. Representação esquemática da construção do vetor mediada por recombinação em levedura. Para a construção do cassete de deleção, as regiões promotora, terminadora e o gene de resistência à higromicina são amplificados e montados no vetor pela levedura *S. cerevisiae* (Adaptação de Schuster et al., 2012).

IV. 5. 1) Amplificação das regiões promotora, terminadora e *hph*

As regiões promotora e terminadora do gene Tr103275 foram amplificados por PCR de acordo com o protocolo da enzima Taq High Fidelity Polymerase, conforme descrito a seguir: desnaturação inicial: 94°C/3 minutos, uma vez; ciclo 1 (40 vezes): 94°C/30 segundos, 65°C/1 minuto, 72°C/2 minutos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez. Para amplificação do gene de resistência à higromicina, foi utilizado o seguinte protocolo: desnaturação inicial: 94°C/3 minutos, uma vez; ciclo 1

(40 vezes): 94°C/30 segundos, 50°C/1 minuto, 72°C/2 minutos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez. Os *primers* utilizados para amplificação da *hph* e das regiões promotora e terminadora dos genes selecionados foram desenhados de acordo com Schuster e colaboradores (Schuster et al., 2012) e estão descritos na Tabela 3. Após a amplificação, os fragmentos foram purificados com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) conforme as especificações do fabricante.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da *hph* e regiões promotora e terminadora do gene Tr103275.

Primer	Sequência
103275-5'F	5'-GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGATGCGACTATCGCTGTATCC-3'
103275-5'R	5'-ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACGGCATGAGAGGCAATATACC-3'
103275-3'F	5'-CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACAAGTCGAGATCACACCTTCC-3'
103275-3'R	5'-GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCTCTGTTTCTCCAAGACAGC-3'
hph-F	5'- GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC-3'
hph-R	5'-GTTGGAGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGAT-3'

IV. 5. 2) Digestão do vetor

O vetor utilizado para transformação da levedura foi o pRS426 (Figura 7). A digestão do vetor com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI foi realizada de acordo com o protocolo FastDigest® conforme especificações do fabricante. Nesta reação foram utilizados: 2µL de DNA (1µg de DNA), 1µL de cada enzima FastDigest® (EcoRI e XhoI), 2µL de tampão FastDigest® 10X e 15µL de água livre de nuclease, sendo as amostras incubadas a 37 °C durante 1 hora.

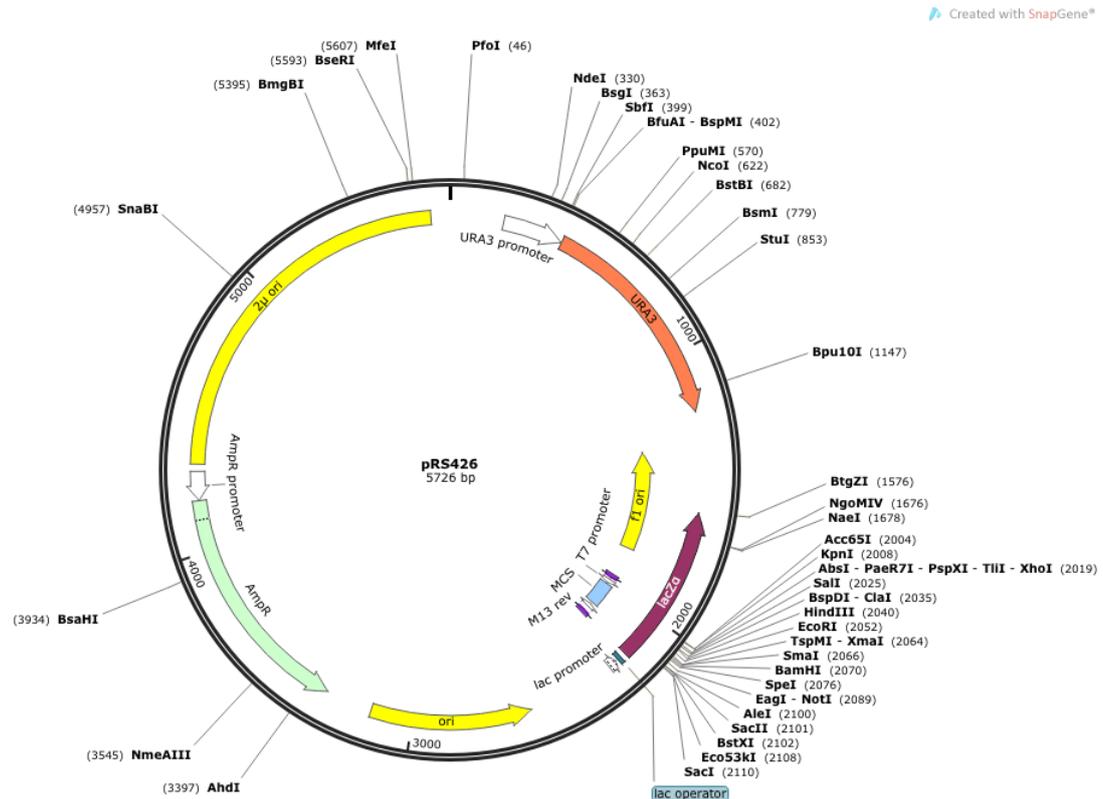


Figura 7. Mapa do plasmídeo pRS426. Esse vetor foi utilizado na transformação da levedura SC9721 para montagem do cassete de deleção gênica.

IV. 5. 3) Transformação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC-9721

O protocolo de transformação utilizado foi de acordo com Schiestle Gietz (Schiestl e Gietz, 1989). A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* SC-9721 foi cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular aplicada às Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

IV. 5. 3. 1) Preparo das células competentes

Para obtenção das células competentes, foi feito um pré-inóculo de SC-9721 em 10 mL de meio YPD (Extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicose 1% (p/v) e incubou-se durante 16 horas a 30 °C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, foi realizado o inóculo de 2,5 mL (a partir do pré-inóculo) em 100 mL de meio YPD e incubou-se por 4 horas a 30 °C sob agitação de 200 rpm. Após tal procedimento, foi realizada uma centrifugação a 5000 g durante 5 minutos e em seguida o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de solução 1x de TE/Acetato de lítio (para um volume final de células igual a 1,5 mL: 150 µL de TE (pH 7,5); 150 µL

de Acetato de lítio 1 M e 1200 µL de H₂O). Após a ressuspensão, foram utilizados 100 µL de células competentes para cada transformação.

IV. 5. 3. 2) Transformação da levedura

Para transformação da levedura foi preparado um mix (mix 1) contendo 3 µL dos fragmentos 5' e 3' do gene de interesse (aproximadamente 300 ng), 3 µL do marcador de seleção *hph* (aproximadamente 300 ng), 2,5 µL do vetor pRS426 digerido (aproximadamente 300 ng) e 100 µg de esperma de salmão (10 mg/mL). Um segundo mix (mix 2) foi preparado contendo 800 µL de PEG 3350 50%, 100 µL de acetato de lítio 1 M e 100 µL de água Milli-Q autoclavada. Em seguida, 600 µL de mix 2 e 100µL de células competentes foram adicionados ao mix 1, sendo esta mistura homogeneizada por inversão e incubada a 30 °C por 30 minutos sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, adicionou-se 70 µL de DMSO e as amostras foram incubadas a 42 °C por 15 minutos seguidos de banho de gelo por 2 minutos. Por fim, 700 µL de água Milli-Q foram adicionados na reação e centrifugou-se por 30 segundos a 13000 rpm. Descartou-se 800 µL de sobrenadante e o restante foi plaqueado em meio SC-URA (*Yeast Nitrogen Base* 7 g/L, glicose 20 g/L, ágar 17 g/L, leucina 0,1 g/L, lisina 0,1 g/L, triptofano 0,1 g/L e histidina 0,05 g/L) durante 4 dias a 30°C.

IV. 5. 4) Extração do DNA genômico da levedura

Para a extração do DNA de levedura, foram utilizados 4 *pools* da placa obtida da transformação para inoculação em 10 mL de meio SC-URA (*Yeast Nitrogen Base* 7 g/L, glicose 20 g/L, leucina 0,1 g/L, lisina 0,1 g/L, triptofano 0,1 g/L e histidina 0,05 g/L) a 30°C por 24 horas. Após a incubação, a cultura celular foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de tampão de extração (Para 1 L: 100 mL de Tris-HCl 2 M pH8, 14,62 g de NaCl, 50 mL de EDTA 0,5 M e 50 mL de SDS 10%). Em seguida, foram adicionadas às amostras pérolas de vidro e a mistura foi agitada em vórtex durante 10 minutos. O sobrenadante desse lisado foi coletado e foi realizada extração com 800 µL de solução de fenol:clorofórmio (1:1), agitando a mistura em vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação durante 15 minutos a 12000 g. Coletou-se a fase superior e em seguida foram adicionados 450 µL de isopropanol.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 1200 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de etanol 70% e as amostras foram centrifugadas novamente a 12000 rpm, 4 °C, durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Por fim, o sedimento foi ressuspensionado com 50 µL em água com 5 µL RNase (10 mg/mL). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%.

IV. 5. 5) Amplificação do cassete de deleção

Para amplificação do cassete de deleção, foram utilizados os primers 5'F e 3'R do gene Tr103275. A PCR foi realizada utilizando a enzima Takara (conforme instruções do fabricante) e a amplificação foi realizada de acordo com o protocolo a seguir: desnaturação inicial: 98°C/10 segundos, uma vez; ciclo 1 (40 vezes): 98°C/7 segundos, 65°C/30 segundos, 72°C/5 minutos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e posteriormente purificados com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) conforme as especificações do fabricante.

IV. 5. 6) Transformação da linhagem TU6_Δ*tku70*

IV. 5. 6. 1) Obtenção dos protoplastos

O protocolo de transformação foi realizado de acordo com Schuster e colaboradores (Schuster et al., 2012). Para obtenção dos protoplastos foi utilizada uma solução de esporos oriunda de meia placa do fungo TU6_Δ*tku70* recém-esporulada (sete dias de cultivo em meio MEX. Após obtenção da solução de esporos, 50 µL desta solução foram espalhados em discos de papel celofane dispostos em placa de cultura contendo meio MEX para germinação durante 20 horas à 30 °C. Em seguida, os esporos oriundos desta placa de germinação foram utilizados para obtenção dos protoplastos. Para isto, foram adicionadas 0,075 g de enzima de lise de *Trichoderma harzianum* (Sigma #L-1412) para 15 mL de solução A (KH₂PO₄ 0,1 M, Sorbitol 1,2 M; pH 5,6), sendo esta solução esterilizada por filtração. Posteriormente, 3 mL desta solução foram inseridos dentro de placa de Petri (90 mm), e adicionou-se 1 papel celofane contendo esporos germinados de *Trichoderma*

inoculados no dia anterior. Novamente, adicionaram-se 2 a 3 mL da solução de lise e outro papel celofane com esporos e assim sucessivamente até utilizar os cinco discos de celofane contendo esporos germinados. Estando cada disco em contato com a solução de lise, a placa com os papéis celofane e a solução de lise foi incubada à 30 °C sob agitação e, após 90 minutos, os discos da solução foram obtidos deixando o micélio dentro da placa. Depois, a solução foi filtrada utilizando de lã de vidro. Centrifugou-se por 10 minutos, 2000 rpm à 4 °C utilizando rotor “*swing out*” e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e os protoplastos sedimentados foram ressuspensos em 4 mL de solução B (CaCl₂.2H₂O 50 mM, Sorbitol 1 M, Tris HCl pH 7,5 10 mM). Novamente, centrifugou-se por 10 minutos, 2000 rpm à 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, 600 µL de solução B foram adicionados aos protoplastos. Para avaliar a eficiência do processo de obtenção de protoplastos, foi utilizado o microscópio. Em todos os casos de crescimento do TU6_Δ*tku70*, 10 mM de uridina foram acrescentados ao meio.

IV. 5. 6. 2) Transformação do fungo

Para transformação, foi utilizado o fragmento de DNA isolado do plasmídeo usando o kit de purificação QIAquick (Qiagen). Para reação de transformação foram adicionados 10 µL (aproximadamente 10 µg) de fragmento de DNA purificado, 200 µL de suspensão de protoplastos e 50 µL de PEG (PEG 6000 25%, CaCl₂.2H₂O 50 mM, Tris HCl pH 7,5 10 mM). Essa reação foi misturada por inversão e posteriormente foram adicionados mais 2 mL de PEG e a mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de solução B e 1 mL desta mistura foi adicionada em 4 mL de meio Overlay (3% de extrato de malte, 2% de agarose e 1 M de sorbitol) (aquecido a 55° C), sendo o meio vertido em placas de meio Bottom com o reagente de seleção (3% de extrato de malte, 2% de ágar e 1 M de sorbitol; higromicina: 1µL para cada 1mL de meio, sendo o estoque à 100 mg/mL). Essas placas foram incubadas à 30° C por 3 a 4 dias. Cada transformante foi retirado da placa (fazendo um corte na mesma) e transferido para pequenas placas de seleção contendo meio MEX com higromicina e estas foram crescidas à 30 °C por 3 a 4 dias até a esporulação. Uma gota de solução de esporos foi obtida a partir destas placas e espalhadas em placas MEX com Triton X-100 (0,1% p/v) para obter colônias individuais a partir dos esporos. Estas colônias de

esporos únicos foram novamente cultivadas em pequenas placas até a esporulação e após três rodadas de MEX com triton para isolamento de esporos, essas colônias foram cultivadas em meio MEX para posterior extração do DNA genômico.

IV. 5. 7) Extração do DNA genômico

Para extração do DNA genômico de *T. reesei*, o fungo foi cultivado em MEX suplementado com uridina e o micélio foi filtrado utilizando miracloth, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. O processo de extração teve início com a maceração dos micélios e ressuspensão da massa micelial obtida em tubos de 1,5 mL contendo 800 µL da solução de extração (EDTA 5 mM, 1,4 M de NaCl e 0,1 M de Tris-Hcl pH 7,5), 10 µL de RNase A (10 mg/mL) e 16 µL de β-mercaptoetanol. A mistura foi vortexada e incubada a 65 °C durante 20 minutos em banho-maria. Após incubação, foram adicionados às amostras 400 µL de fenol e 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1). As amostras foram vortexadas novamente e centrifugadas a 20000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1), vortexado e centrifugado a 20000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo contendo 800 µL de isopropanol e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 20000 g por 30 minutos a 4 °C. O isopropanol foi então descartado e o DNA foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 20000 g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado então secou a temperatura ambiente e foi ressuscitado com 100 µL de água livre de nuclease. O DNA resultante foi então tratado com RNase (10 mg/mL) na proporção 1/10 volumes e incubado por uma hora a 37 °C em banho-maria. A integridade do DNA foi avaliada por gel de agarose 1% e as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

IV. 5. 8) Confirmação da deleção de *azf1* na linhagem mutante

Para verificar se a deleção do gene Tr103275 (*azf1*) foi satisfatória, foram realizadas duas PCRs: uma para verificar a presença ou ausência da ORF do gene analisado e outra para avaliar o marcador de seleção, *hph*. Ambas reações foram realizadas de acordo com o protocolo Taq Taq High Fidelity Polymerase. Para amplificação da ORF do gene Tr103275, os ciclos consistiam em: desnaturação inicial: 94°C/3 minutos, uma vez; ciclo 1 (40 vezes): 94°C/30 segundos, 52°C/1

minuto, 72°C/2 minutos e 30 segundos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez. Para amplificação do gene de resistência à higromicina, foi utilizado o seguinte protocolo: desnaturação inicial: 94°C/3 minutos, uma vez; ciclo 1 (40 vezes): 94°C/30 segundos, 60°C/1 minuto, 72°C/1 minuto e 30 segundos; finalização: 72°C/10 minutos, uma vez. Os primers utilizados para a verificação dos possíveis mutantes estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Primers utilizados para verificação dos possíveis mutantes.

Primer	Sequência foward	Sequência reverse
103275_ORF	TCTCACCAGATTCCACAGAG	CTCGCAATGCCCATGTGAAA
hph	GCGGAGGCCATGGATGCGAT	GCGCTTCTGCGGGCGATTTG

Além das PCRs, foi realizado um Souther blot utilizando o DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche), de acordo com as instruções do fabricante.

IV. 6) Avaliação do perfil de crescimento e esporulação da linhagem $\Delta azf1$

Para a medição do peso seco das linhagens parental e $\Delta azf1$, ambas foram crescidas em meio Mandels-Andreotti contendo 2% de glicose por 24 horas e o micélio coletado foi colocado em estufa à aproximadamente 80 °C até completa secagem. Para avaliar o perfil de crescimento de $\Delta azf1$ em diferentes fontes de carbono, as linhagens parental e mutante foram crescidas em placas de meio mínimo (0.1% MgSO₄.7H₂O, 1% KH₂PO₄, 0.6% (NH₄)₂SO₄, 0.3% C₆H₅Na₃O₇.2H₂O, solução de elementos traços 1X e 1.5% ágar) contendo 1% (p/v) de fonte de carbono (glicose, amido, lactose, sacarose, glicerol ou celulose) e PDA. O crescimento em diferentes pHs também foi verificado. Para isso, placas com meio PDA (pH 5,6) foram ajustadas para os pHs 5, 7, 9 e 11 com HCl 3 M e NaOH 6 M, até atingir o pH esperado. O crescimento em placa das linhagens parental e $\Delta azf1$ ocorreu à temperatura de 28 °C foi registrado no 4^o e 7^o dias. O perfil de esporulação em *race tubes* foi feito com meio MEX sólido e o crescimento das linhagens parental e mutante foi observado durante 14 dias. Em relação às linhagens parental e $\Delta azf1$, foram acrescentados a todos meios de cultivo 10 mM de uridina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

IV. 7) Citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo, as linhagens parental e $\Delta azf1$ de *T. reesei* foram cultivadas em placas contendo meio sólido MEX por cinco dias para obtenção dos esporos. Para avaliar o tamanho e complexidade celular, os esporos foram ressuspensos em PBS a uma concentração de 10^5 /mL e avaliados usando o software Express Pro Blue com os parâmetros Forward Scatter (FSC-H) e Side Scatter (SSC-H), respectivamente. Para análise do ciclo celular, a incorporação de iodeto de propídio (PI) foi medida por um detector de fluorescência. Para isso, os esporos foram ressuspensos em uma solução de PI (0,1% (v/v) de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio, 0,9 U/mL de RNase A e 50 μ g/mL de iodeto de propídio) a uma concentração de 10^5 /mL (Gonçalves et al., 2011). A suspensão celular foi mantida no escuro por 1,5 horas à temperatura ambiente. As suspensões celulares foram analisadas por citometria de fluxo (Guava easyCyte, Guava Technologies, Millipore, Hayward, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

IV. 8) Avaliação da expressão de genes holocelulolíticos no mutante $\Delta azf1$

IV. 8. 1) Crescimento das linhagens parental e mutante em celulose e bagaço de cana

As linhagens de *T. reesei* parental e $\Delta azf1$ foram crescidas em meio MEX a 28 °C durante o período de sete dias. Para os experimentos de indução, 10^6 esporos/mL do parental e $\Delta azf1$ foram inoculados 25 mL de meio Mandels-Andreotti contendo 1% de glicerol. Após 24 horas, o micélio foi coletado, lavado com meio Mandels-Andreotti sem fonte de carbono e transferido para 25 mL de meio Mandels-Andreotti com 1% de celulose ou bagaço de cana. Os frascos foram incubados a 200 rpm, em agitador orbital, a 28 °C por 8, 12 e 24 horas. Em relação às linhagens parental e $\Delta azf1$, foram acrescentados a todos meios de cultivo 10 mM de uridina. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra. Após a indução, os micélios foram coletados por filtração, congelados e estocados a -80°C.

IV. 8. 2) qRT-PCR para avaliação da expressão dos genes celulolíticos

Os micélios de *T. reesei* parental e $\Delta azf1$ crescidos nas condições citadas acima foram macerados para extração do RNA total. Cada amostra teve seu RNA

extraído utilizando-se o reagente da Life Technologies TRIzol[®] RNA, de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA e a qRT-PCR foram realizadas conforme descrito na seção IV. 2. 2. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade total de cDNA presente em cada reação. Os primers utilizados para amplificação dos genes identificados estão descritos na Tabela 5. Os testes estatísticos foram realizados com One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni disponível no software do Prisma v. 5.0, comparando-se o nível de expressão de parental e selvagem, em cada condição. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. O software Mev 4.8.1 foi utilizado para a construção do *heat map*.

Tabela 5. Primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR para análise da expressão dos genes holocelulolíticos.

Protein ID ^a	Gene	Sequência Foward	Sequência Reverse
72567	cel6a	ACA AGA ATG CAT CGT CTC CG	TGT TCC ACC CGT TGT AGT TG
76672	cel3a	CTG TAC ATC ACC TAC CCA TC	TAG CTG AGA TCT CGT CGT C
123989	cel7a	CCG AGC TTG GTA GTT ACT CTG	GGT AGC CTT CTT GAC TGA GT
123992	swo	GAG TGA ATG TCT TGA TGG	CCA AAC TAT ACG AGT AGC C
120749	cel1a	TTT GCC TGG TCG CTC ATG	AAT CAG CTC GTC AAA CAG CG
73643	cel61a	GCG CCA CTG TTC CTG GAG	ACC GCT GCC ACC ACA CTG
49976	cel45a	CAG CGA CGT CTA CAT TGG	TGG TCC AGA ATG CAC TCG
122081	cel7b	CCC TCA ACA CTA GCC ACC AG	AGG TCT TGG AGG TGT CAA CG
22197	cel1b	CCA TCT ACA TCA CCG AGA ACG	TCC AAG TGC GAG TCA AAG TAG
121735	cel3b	CCA GGA TAA CTT CAA CGA GGG	ATG TGG AGG TTG GAG AAC TTG
82227	cel3c	GCG TAC AAT GGC ATC AAT GG	ATC CCA ACC CCA TTC CTT TC
120312	cel5a	GCC ACT ACT ATC ACC ACT TCG	GTA CAG CCA AAG TCA AAA CCC
82616	cel5b	AAA GTA CCG TCC AAC ACC C	TGG TAA CAG CAT TGG GAG TG
123232	cel12a	AGA TTG CCA TTC CCC AGA AG	CCC GAG TAC GTG ACA TGA TTC
120961	cel61b	ACT ATG TCT TCC GCC ATG AAC	CAC GCA CTG AGG ATA GTT CTG
46816	cel3d	AAC CCA GCA TAT CTC AAC TAC G	CTT GAA GGT AGC GTA AGA CAG G
76227	cel3e	ATG TCT GGA AGT GAG GTT GC	TCG TGA GTC CAA AGT GAA CAG
49081	cel74a	GCC TTG TAT CTG ACC TAT TCC G	TGA TGT CTT TCC AAG TTC CCC
74223	xyn1	GGC CAA ATT ATC GTC AAC TGT C	TCT GTC TTT TGG GCT TGG AG
123818	xyn2	TGT CAA CGA GCC TTC CAT C	TCT GCA CAG TAA CAG TTC CG
120229	xyn3	AAG TCA TCC GCA CCC ATG	GTT CAA AAC TCA CCC AAG CAC
111849	xyn4	TGT CAG CAA TTC GGG TCT TC	GAC AGG TTG GCA AAA TGG TG
44504	actina	TGA GAG CGG TGG TAT CCA CG	GGT ACC ACC AGA CAT GAC AAT GTT

^aID, identificação de acordo com o banco de dados do genoma de *T. reesei* (<http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>).

IV. 9) Predição do motivo de ligação de Azf1 ao DNA através de análise de bioinformática

As sequências de proteína e DNA de *T. reesei* utilizadas nas análises de bioinformática foram obtidas do JGI Genome Portal (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). A estimativa da especificidade da ligação de Azf1 ao DNA foi realizada utilizando uma abordagem que emprega cálculos empíricos de energias de interação de aminoácidos e nucleotídeos emparelhados, para prever matrizes de peso de posição que representam a especificidade de ligação do DNA ao fator de transcrição do tipo dedo de zinco, disponível na ferramenta *online* <http://zf.princeton.edu> (Persikov e Singh, 2013). A ocorrência de motivos individuais na região promotora (1 kb) dos treze genes regulados por Azf1 foi avaliada através do software FIMO (Grant et al., 2011), disponível em <http://meme-suite.org/>.

IV. 10) Expressão heteróloga do motivo dedo de zinco de Azf1

IV. 10. 1) Linhagens e plasmídeos utilizados

E. coli DH5 α foi utilizada nos experimentos de clonagem e a linhagem BL21 (DE3) para expressão da proteína. Três plasmídeos foram utilizados nesse estudo, são eles: TrAzf1234-370_pMA-T, pET42bAfSrbA161-267 e pET42bTrAzf1234-370. O plasmídeo TrAzf1234-370_pMA-T (Invitrogen) possui uma sequência sintética correspondente aos aminoácidos 234-370 que compreende o motivo dedo de zinco de Azf1. Uma clivagem com as enzimas de restrição BamHI e HindIII foi realizada para liberar a sequência TrAzf1234-370. As mesmas enzimas foram utilizadas para clivar o plasmídeo pET42bAfSrbA161-267. Os produtos de clivagem foram ligados com o Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche) de acordo com as instruções de fabricação. O produto de ligação foi utilizado para transformar a *E. coli* DH5a. O plasmídeo resultante pET42bTrAzf1234-370 (Figura 8) possui a sequência do gene sintético TrAzf1234-370, a *tag* glutationa S-transferase (GST), o sítio de clivagem para a protease TEV (do inglês, *Tobacco Etch Virus*) e resistência à canamicina, totalizando 6127 pares de bases.

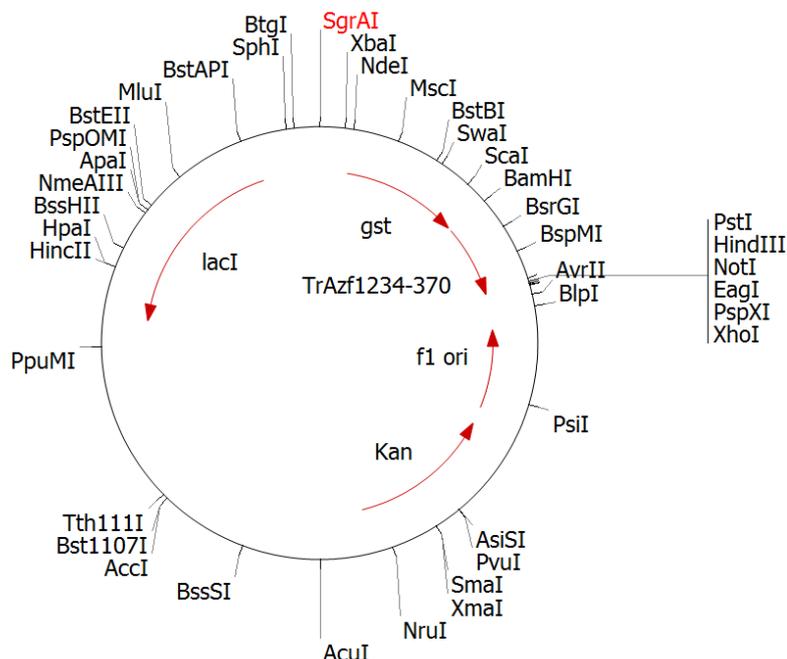


Figura 8. Mapa do plasmídeo pET42bTrAzf1234-370. O plasmídeo possui a sequência do gene sintético TrAzf1234-370, a tag GST, o sítio de clivagem para a protease TEV e resistência à canamicina.

A sequência do plasmídeo pET42bTrAzf1234-370 foi confirmada por sequenciamento e utilizada para transformar a *E. coli* BL21 (DE3).

IV. 10. 2) Transformação de *E. coli*

E. coli DH5 α e BL21 (DE3) foram transformadas segundo os protocolos descritos abaixo. Os plasmídeos foram isolados com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit e QIAfilter Plasmid Mid Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

IV. 10. 2. 1) Transformação de *E. coli* DH5 α

Para a transformação de *E. coli* DH5 α , 200 μ L de células competentes foram misturadas com 21 μ L do produto de ligação e essa mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. Em seguida, um choque térmico foi realizado a 42 $^{\circ}$ C por dois minutos, seguido de incubação em gelo por um minuto. Posteriormente, foram adicionados 750 μ L de meio SOC (à temperatura ambiente) e a amostra foi mantida a 37 $^{\circ}$ C durante 1 hora, a 200 rpm. A *E. coli* (aproximadamente 200 μ L) foi plaqueada em meio LB com canamicina (50 μ g/mL) e incubada a 37 $^{\circ}$ C durante a noite.

IV. 10. 2. 2) Transformação de *E. coli* BL21 (DE3)

Para a transformação da *E. coli* BL21 (DE3), a bactéria foi previamente mantida em gelo durante 10 minutos. Em seguida, 50 µL de células competentes foram incubados com 1 µL de DNA em gelo durante 30 minutos. Posteriormente, um choque térmico foi realizado a 42 °C durante 10 segundos, seguido de incubação em gelo durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 950 µL de meio SOC (à temperatura ambiente) e a amostra foi mantida a 37 °C durante 1 hora, a 200 rpm. *E. coli* (aproximadamente 200 µL) foi plaqueada em meio LB com canamicina (50 µg/mL) e incubada a 37 °C durante a noite.

IV. 10. 3) Determinação dos parâmetros de expressão da proteína

E. coli BL21 (DE3) carregando o plasmídeo pET42bTrAzf1234-370 foi inoculada em 3 mL de LB com canamicina (50 µg/mL) e crescida a 37 °C e 200 rpm durante 5 horas. Após este tempo, a cultura foi transferida para 10 mL de meio TB (Novagen) com canamicina (50 µg/mL) e incubada durante 24 horas a 200 rpm e temperaturas de 25 °C e 30 °C. Quantidades iguais de *E. coli* (densidade óptica = 10) foram centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos e os *pellets* foram dissolvidos em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, glicerol 5% (v/v), ZnCl₂ 25 µM, Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) 0,5 mM e AEBSF 1 mM) contendo diferentes concentrações de sal: 150 mM, 250 mM, 500 mM e 700 mM de NaCl. As amostras foram sonicadas e em seguida centrifugadas durante 15 minutos a 13500 rpm e 4 °C. O sobrenadante (fração solúvel) foi recolhido e o *pellet* (fração insolúvel) foi dissolvido no tampão de lise correspondente. O perfil proteico em cada fração foi visualizado por SDS-PAGE.

IV. 10. 4) Expressão solúvel de TrAzf1234-370

E. coli BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET42bTrAzf1234-370 foi inoculada em 3 mL de LB com canamicina (50 µg/mL) e incubada durante a noite a 37 °C e 200 rpm. Posteriormente, transferiu-se 3 mL do meio de cultura para 1 L de meio TB contendo canamicina (50 µg/mL), ZnCl₂ (100 µM) e uma gota de antiespumante 204. O sistema foi incubado a 25 °C durante 24 horas sob constante agitação. Após 24 horas, a cultura foi centrifugada a 6500 rpm durante 20 minutos, e o *pellet* foi recolhido e armazenado a -80 °C.

IV. 10. 5) Purificação de Azf1

IV. 10. 5. 1) Preparação da amostra

A biomassa de *E. coli* armazenada a -80 °C foi quebrada em pequenos fragmentos e colocada em um novo recipiente contendo 300 mL do tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 5% (v/v) de glicerol, 25 µM ZnCl₂, TCEP 0,5 mM, AEBSF 1 mM e NaCl 150 mM). A biomassa ressuspensa foi homogeneizada em um Ultra Turrax RW 28 basic (IKA) e depois transferida para o homogeneizador de alta pressão Emulsiflex C5 (Avestin) para o rompimento celular e liberação de proteína. O lisado resultante foi tratado com 15 mL de PEI 2% (p/v) pH 7,0 e centrifugado a 20000 rpm durante 20 minutos. Todas estas etapas foram realizadas a 4 °C. Após a centrifugação, o pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5 com Tris 1M e filtrado. Ao final, foram adicionados 185 mL do tampão de lise à amostra. Nas próximas etapas, o sistema Äkta Explorer (GE Healthcare) foi usado para purificação da proteína.

IV. 10. 5. 2) Purificação do dedo de zinco de Azf1

No primeiro passo de purificação da proteína, a amostra foi inserida em uma coluna GSH Sepharose 4FF (50 mL) e lavada com o tampão de lise (sem AEBSF), seguido de tampão de lavagem contendo Tris-HCl 100 mM pH 8,0, 5% (v/v) glicerol, ZnCl₂ 10 µM, TCEP 0,5 mM e NaCl 400 mM. A eluição da proteína fusionada à GST foi realizada com o tampão de eluição (tampão de lavagem + glutathione reduzida 20 mM) e uma fração de 50 mL foi recolhida. Para a purificação do dedo de zinco de Azf1, 50 mL da fração eluída da GSH Sepharose 4FF foram tratados com 1,57 mL de protease TEV por 48 horas. Após a incubação com TEV, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente e filtrada. Em seguida, a amostra foi inserida em uma coluna 2x 5 mL HiTrap Q FF para obter a proteína livre de DNA e lavada com tampão (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, ZnCl₂ 25 µM e TCEP 0,5 mM). A eluição foi realizada com um gradiente de até 1 M de NaCl (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 25 µM ZnCl₂ e 0,5 mM TCEP). O *flowthrough* obtido a partir da coluna HiTrap Q FF foi inserido em uma coluna SP Sepharose HP (20 mL) e as etapas de lavagem e eluição foram realizadas com os mesmos tampões usados para a coluna HiTrap Q FF. As frações obtidas da purificação em SP Sepharose HP foram concentradas para 4 mL utilizando Amicon Ultra-15 10K (Merck

Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra concentrada foi carregada na coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 utilizando um tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 400 mM, ZnCl₂ 100 µM e TCEP 0,5 mM. O perfil de proteína em cada fração foi visualizado por SDS-PAGE e a proteína foi armazenada em 50% de glicerol a -20 °C.

IV. 11) Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

As análises de Ressonância Plasmônica de Superfície em tempo real foram realizadas no instrumento BIAcore T200 System (GE Healthcare) a 25 °C. DNAs dupla-fita biotinizados foram produzidos a partir do anelamento e oligonucleotídeos complementares utilizando um excesso molar de cinco vezes dos oligonucleotídeos não biotinizados. Os oligonucleotídeos utilizados na análise de SPR estão descritos na Tabela 6. Um sítio de ligação para CBC (do inglês, CCAAT-*binding complex*) de *A. nidulans* foi utilizado na última *flow cell* como controle negativo.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados na análise de SPR.

Oligonucleotídeo ^a	Sequência ^{bc}
BTrcel7a-611-25	5'-GAAGTGAAAGAAGACAGAGGTAAGA-3'
Trcel7a-611-25	5'-TCTTACCTCTGTCTTCTTTCACTTC-3'
BTrswo1-951-25	5'-AGGAACGAACACGGAGGAGGGGGCG-3'
Trswo1-951-25	5'-CGCCCCCTCCTCCGTGTTTCGTTCT-3'
BAncccAp-379-25	5'-ACCCGAG <u>CCAAT</u> CAGAGCGAAGTGA-3'*
AncccAp-379-25	5'-TCACTTCGCTCTG <u>ATTGG</u> CTCGGGT-3'

^aA letra B indica o oligonucleotídeo biotinizado.

^bO sítio de ligação para CBC está sublinhado.

^cOs motivos de ligação individuais encontrados com o software FIMO são destacados em vermelho.

Os DNAs produzidos foram diluídos para 2,5 nM em tampão HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA e 0,005% (v/v) surfactante P20) e injetados em *flow cells* de um chip CM3 (Sigma) revestido com estreptavidina com um fluxo de 10 µL/min até alcançar 100 unidades de ressonância (RU, do inglês *resonance units*) de DNA ligado. O dedo de zinco de Azf1 puro foi transferido para o tampão de corrida (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% (v/v) surfactante P20, 5 mM β-mercaptoetanol e 10 µM ZnCl₂) utilizando uma coluna PD mini-trap G-25. Sete concentrações da proteína testada (200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM e 3,125 nM) foram injetadas em tampão de corrida a uma taxa de 30

$\mu\text{L}/\text{min}$. Os tempos de associação e de dissociação do complexo formado foram de 200 e 400 segundos, respectivamente. Cada injeção foi efetuada em duplicata. A superfície do chip foi regenerada com 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA e 0.005% (p/v) SDS. Para testar a especificidade do complexo, cinco concentrações de poli dI:dC (5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram testadas com 200 nM da proteína injetada a uma taxa de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Erros no índice refrativo devido ao solvente foram corrigidos através da resposta obtida na *flow cell* livre de DNA.

Resultados

V) RESULTADOS

V. 1) Identificação dos fatores de transcrição de *S. cerevisiae* e respectivos homólogos em *T. reesei* possivelmente envolvidos na desconstrução da lignocelulose

A análise bioinformática dos dados de RNA-seq realizada em nosso laboratório permitiu a identificação de motivos de ligação que se conservavam em genes com expressão diferencial durante o cultivo em diferentes fontes de carbono. Foram identificados cinco fatores de transcrição potencialmente associados ao reconhecimento de motivos de ligação em genes co-regulados frente diferentes fontes de carbono. Em *S. cerevisiae*, eles foram identificados como sendo as proteínas regulatórias AZF1, SFL1, MOT3, RME1 e MAC1. Através da ferramenta BLAST, disponível no banco de dados de *T. reesei* (<http://genome.igipsof.org/Trire2/Trire2.home.html>), foi feita uma busca entre as principais proteínas homólogas no fungo filamentoso *T. reesei*, as quais estão descritas na Figura 9. Essas 14 proteínas de *T. reesei* foram o ponto de partida para as análises posteriores de perfil de expressão gênica de modo a entender o papel desses fatores de transcrição no processo de desconstrução da biomassa lignocelulósica.

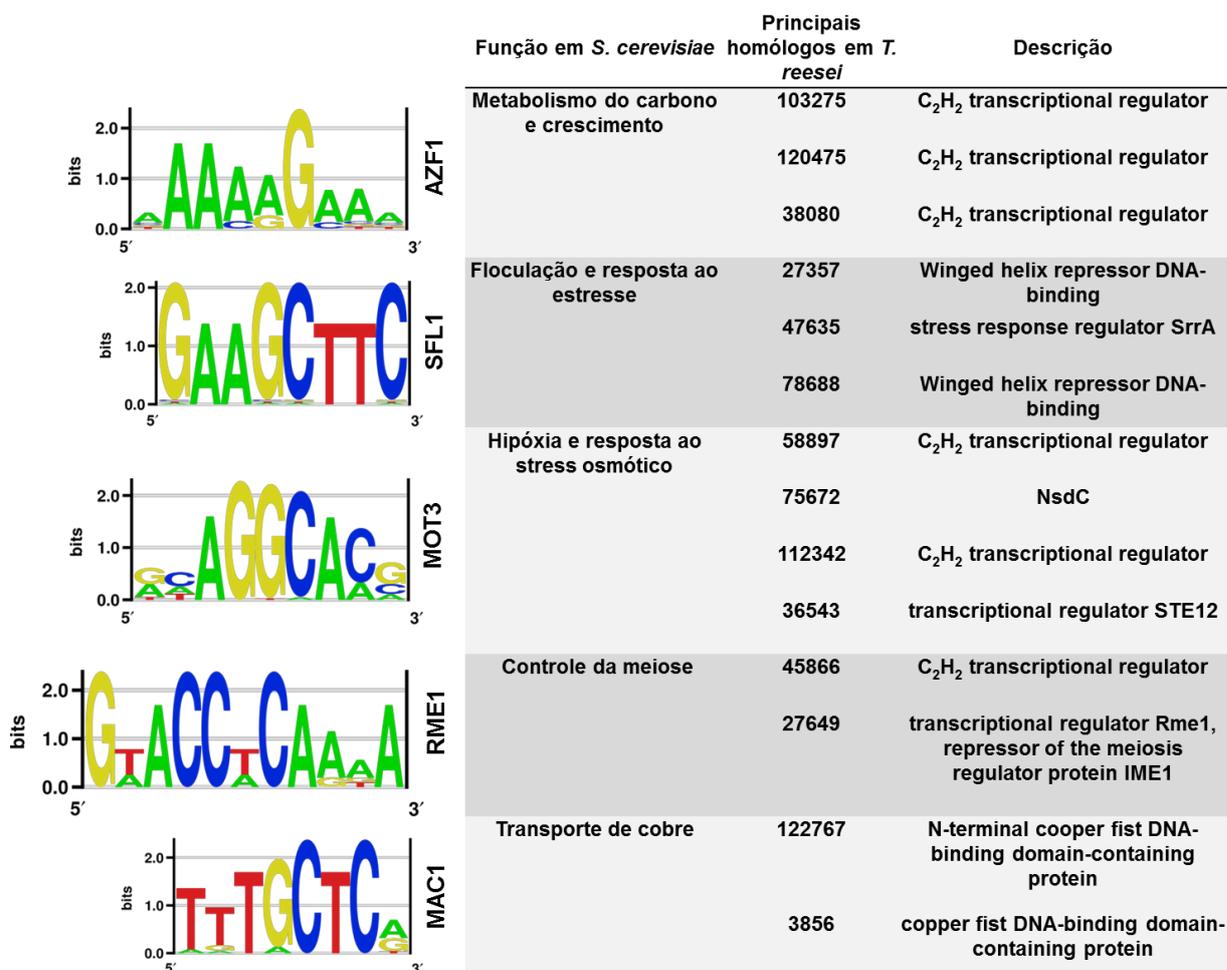


Figura 9. Fatores de transcrição potencialmente associados à degradação da biomassa em *T. reesei*. Em *S. cerevisiae*, os motivos identificados correspondem às proteínas regulatórias AZF1, SFL1, MOT3, RME1 e MAC1. Os principais homólogos em *T. reesei* foram obtidos com auxílio da ferramenta BLAST.

V. 2) Atividades enzimáticas do QM9414: CMCase e FPase

A linhagem QM9414 de *T. reesei* foi crescida em bagaço de cana a fim de se verificar o comportamento da expressão gênica dos 14 fatores de transcrição identificados pela análise *in silico*. Enquanto o micélio foi utilizado nas qRT-PCRs, os sobrenadantes foram utilizados para verificação das atividades enzimáticas e dosagem de glicose na linhagem QM9414 durante o crescimento nessa fonte de carbono. As atividades enzimáticas de CMCase e FPase foram realizadas para verificar, respectivamente, endoglicanases e celulase total secretadas pela linhagem QM9414 durante a indução por bagaço de cana. Em relação à CMCase, não foi observada atividade nas primeiras 24 horas de indução. A partir de 48 horas, o fungo começa a produzir endoglicanases e a atividade máxima ocorre nos tempos de 72 e 96 horas, quando atinge aproximadamente 0,15 U/mL (Figura 10A). Em

relação à produção de celulase total, é possível observar que no período de 24 horas de cultivo a atividade de FPase atinge uma taxa de 0,04 U/mL. Essa atividade vai aumentando ao longo do tempo e atinge seu máximo em 96 horas, quando a produção chega a aproximadamente 0,1 U/mL (Figura 10B).

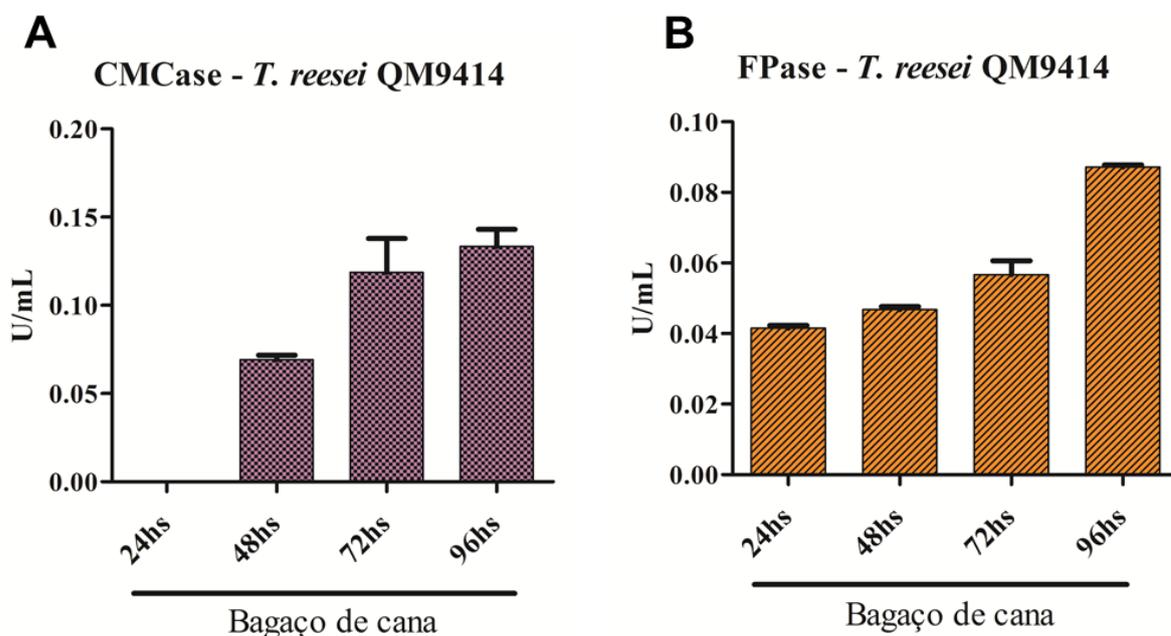


Figura 10. Atividades enzimáticas da linhagem QM9414 crescida em bagaço de cana. O sobrenadante foi obtido nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A) CMCase (endoglicanase). B) FPase (celulase total).

Em ambas as análises nós constatamos que houve produção de celulases pelo fungo *T. reesei* QM9414, confirmando o efeito indutor do bagaço de cana.

V. 3) Dosagem de glicose do QM9414 em bagaço de cana

O mesmo sobrenadante utilizado para avaliação da atividade enzimática pelo fungo *T. reesei* QM9414 foi empregado para a dosagem de glicose resultante no meio de cultura durante os quatro tempos de cultivo em bagaço de cana. Para tal, foi usado o kit Glicose Liquiform, cujo princípio consiste na oxidação de glicose pela ação da glicose oxidase formando peróxido de hidrogênio, que por sua vez reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação de uma peroxidase, formando um composto vermelho cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra.

É possível observar que nos quatro tempos de cultivo a concentração de glicose manteve-se estável e em níveis baixos, atingindo o máximo de 0,7 mg/mL no tempo de 96 horas (Figura 11).

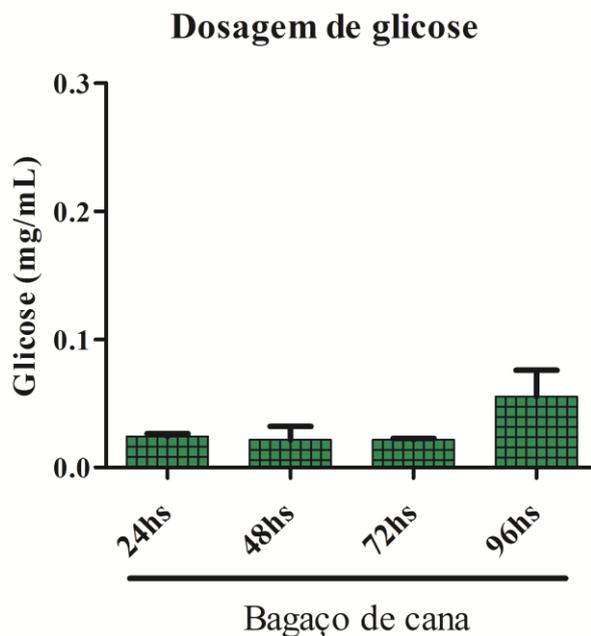


Figura 11. Dosagem de glicose. A linhagem QM9414 foi cultivada em bagaço de cana por 24, 48, 72 e 96 horas e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de glicose utilizando o kit Glicose Liquiform.

Tal observação indica que toda glicose produzida pelo fungo através da degradação do bagaço de cana pelas enzimas celulolíticas é imediatamente consumida, o que mantém o nível de glicose no sobrenadante do meio de cultura em níveis baixos.

V. 4) Perfil de expressão gênica dos fatores de transcrição candidatos

O micélio da linhagem QM9414 de *T. reesei* crescida em glicerol, bagaço de cana e glicose foi coletado e utilizado para extração do RNA total. Posteriormente, foi realizada a avaliação da expressão gênica absoluta dos 14 fatores de transcrição previamente selecionados através de PCR em tempo real, utilizando o gene da actina como controle endógeno. Como se pode observar na Figura 12, cinco genes mostraram-se mais expressos durante o cultivo em bagaço de cana quando comparado à glicose. São eles: Tr38080, Tr122767, Tr103275, Tr3856 e Tr120475. Dentre esses cinco genes, a diferença mais expressiva foi observada nos genes Tr103275 e Tr38080, ambos homólogos ao fator de transcrição Azf1 de *S. cerevisiae*

(Azf1/YOR113W). Como Tr103275 apresenta maior homologia ao Azf1 de *S. cerevisiae* que o Tr38080, segundo a ferramenta BLAST, nós escolhemos esse fator de transcrição para dar continuidade aos experimentos de deleção gênica em *T. reesei*.

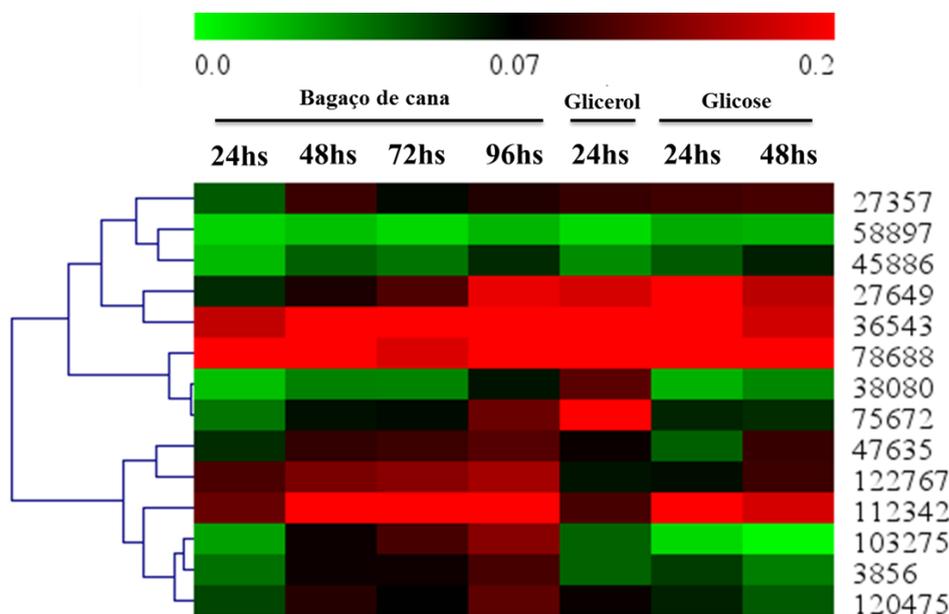


Figura 12. Expressão gênica absoluta através de qRT-PCR dos fatores de transcrição candidatos. Cinco genes mostraram-se mais expressos durante o cultivo em bagaço de cana quando comparado à glicose. São eles: Tr38080, Tr122767, Tr103275, Tr3856 e Tr120475. A escala do heat map indica a expressão absoluta dos genes avaliados. O software Mev 4.8.1 foi utilizado para a construção do *heat map*. A clusterização gênica foi feita pelo método average linkage utilizando a correlação de Pearson como distância métrica.

V. 5) A expressão do homólogo de *azf1* de *T. reesei* é induzida pela biomassa vegetal e reprimida por glicose

Para entender o papel de Azf1 em *T. reesei*, nós primeiramente verificamos a expressão desse regulador em diferentes fontes de carbono. A expressão do gene *azf1* foi fortemente induzida em bagaço de cana e celulose, enquanto que em glicose, a expressão desse gene foi praticamente indetectável (Figura 13).

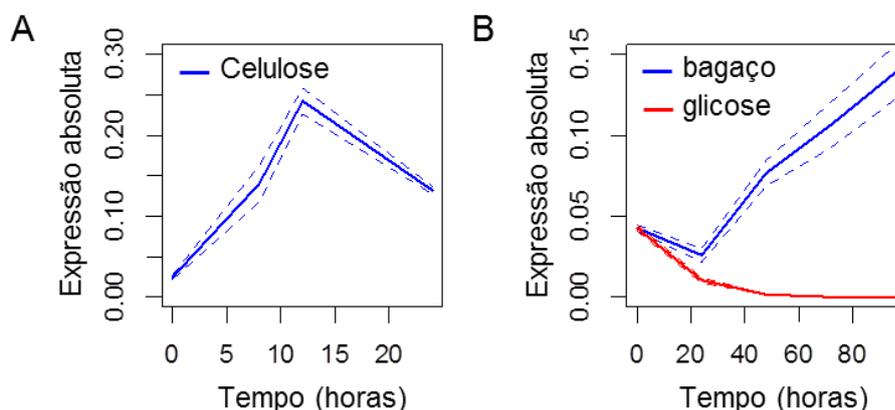


Figura 13. Expressão do gene *azf1* em diferentes fontes de carbono. A expressão gênica foi obtida por qRT-PCR usando actina como controle endógeno. A) Celulose. B) Bagaço de cana e glicose.

Esta forte indução durante a exposição ao material lignocelulolítico e a repressão em presença de glicose sugere que este fator de transcrição pode estar envolvido na expressão das enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da biomassa vegetal.

V. 6) Análise filogenética do fator de transcrição Azf1

A proteína Azf1 de *T. reesei* (Tr103275) foi escolhida com base em seu homólogo bem descrito para a levedura *S. cerevisiae* (AZF1/YOR113W) através de análise no BLAST pelo JGI Genome Portal (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). A análise filogenética entre o fator de transcrição Azf1 de diferentes espécies mostra que o regulador em *T. reesei* encontra-se mais próximo aos homólogos das espécies *Escovopsis weberi*, um micoparasita de formigas cultivadoras de fungos, e *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico (Figura 14).

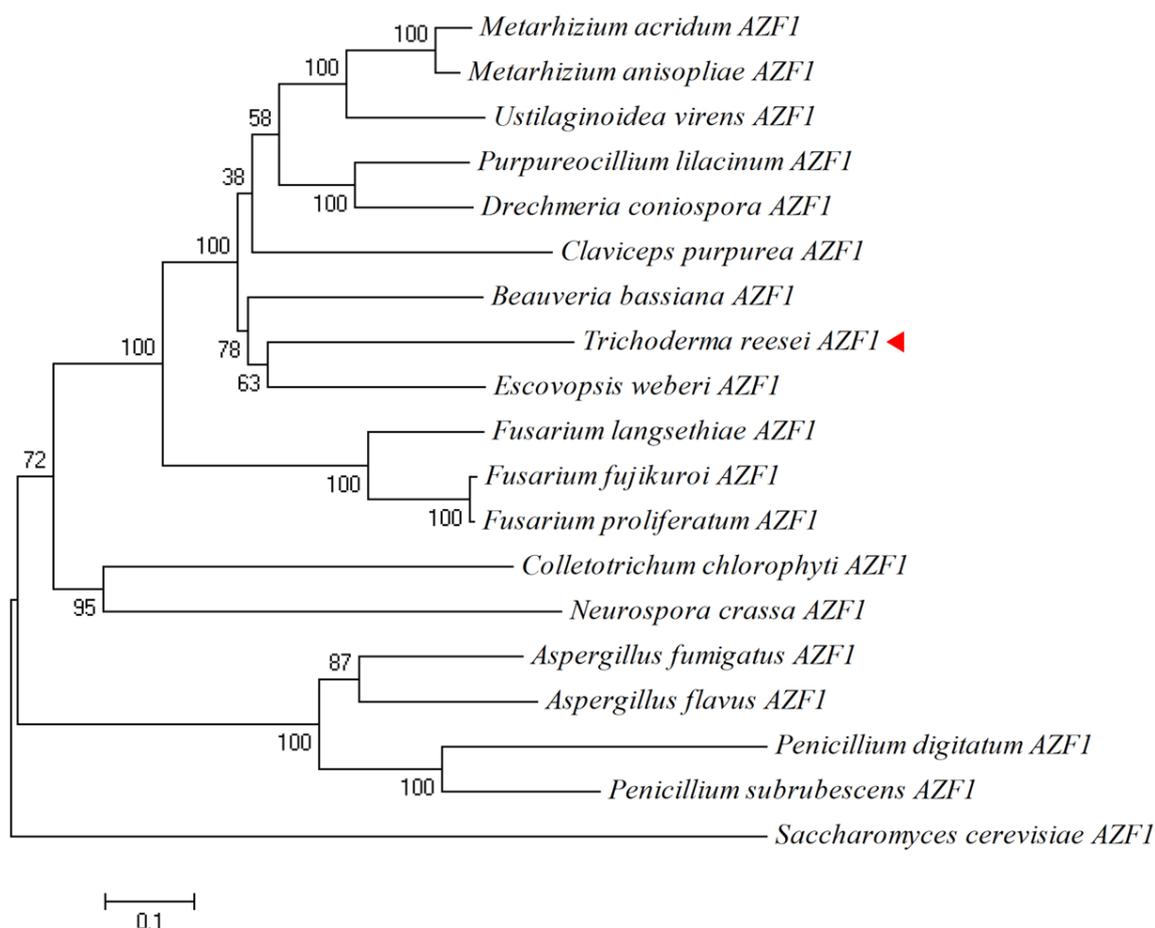


Figura 14. Árvore filogenética dos homólogos de Azf1 de diferentes espécies. A árvore foi criada pelo programa Mega 4 com 1000 *bootstraps*.

O fator de transcrição Azf1 da levedura *S. cerevisiae* apresenta uma identidade de 51% com o seu homólogo em *T. reesei*, entretanto, encontra-se mais distante na árvore filogenética que outros fungos não leveduriformes.

V. 7) O gene *azf1* foi deletado com sucesso *T. reesei*

V. 7. 1) A montagem do cassete de deleção pela levedura *S. cerevisiae*

O primeiro passo para o processo de deleção do gene *azf1* (Tr103275) de *T. reesei* foi a montagem do cassete de deleção pela levedura *S. cerevisiae*. Para isso, as regiões promotora (5') e terminadora (3') do gene *azf1* e o gene de resistência à higromicina foram amplificados e purificados em seguida com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Os amplicons obtidos possuem os seguintes tamanhos e podem ser observados claramente no gel de agarose representado na Figura 15A: 5': 1003 pares de base (pb); 3': 1115 pb e higromicina: 1432 pb. Com os fragmentos

amplificados e purificados, a levedura foi transformada para realizar a montagem do cassete de deleção, que ocorreu de forma satisfatória, como observado na Figura 15B.

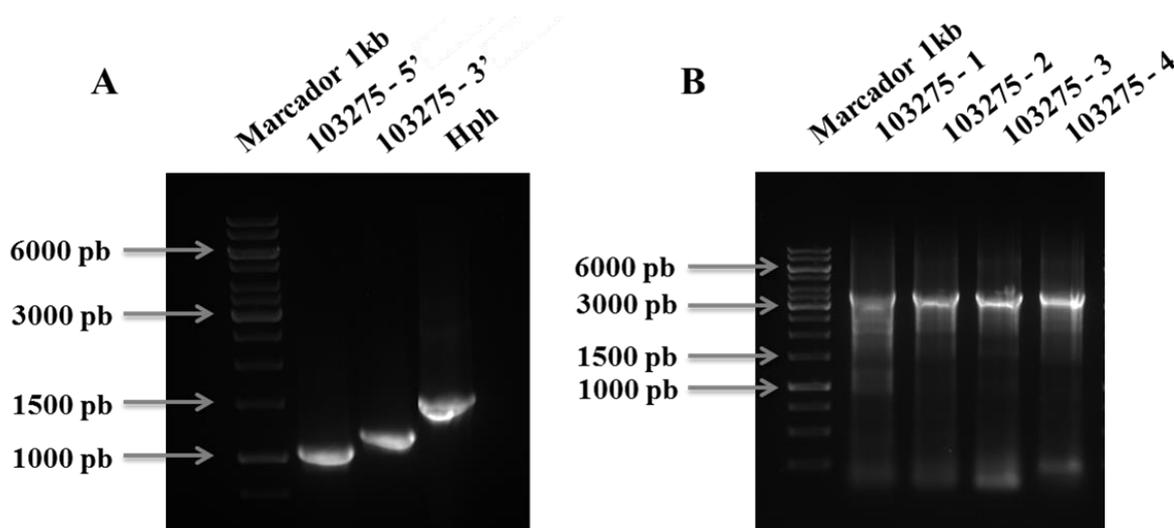


Figura 15. Montagem do cassete pela levedura *S. cerevisiae*. A) Gel de agarose mostrando os produtos de PCR purificados das regiões 5', 3' e do gene de resistência à higromicina. B) Gel de agarose mostrando a amplificação do cassete de deleção de 3350 pares de base referente ao gene *Tr103275*.

Os quatro cassetes foram amplificados com sucesso e posteriormente juntados e purificados com o kit QIAquick PCR Purification. O cassete formado possui 3350 pares de base e foi utilizado para a transformação da linhagem de *T. reesei* TU6_Δ*tku70* (parental).

V. 7. 2) Verificação dos possíveis mutantes obtidos

Os cassetes de deleção obtidos na Figura 15 foram utilizados para transformar a linhagem parental de *T. reesei* TU6_Δ*tku70*. Após sucessivas etapas de seleção em meios de cultivo MEX-higromicina e MEX-higromicina com triton, foram obtidos aproximadamente 20 possíveis transformantes positivos. Para verificar se o gene *azf1* foi deletado com sucesso, o DNA/RNA de cada transformante foi extraído e a ORF correspondente ao gene *azf1* foi amplificada por PCR convencional e RT-qPCR.

Na Figura 16A é possível observar uma banda de 1508 pares de base correspondente à ORF do gene *azf1* na linhagem parental. Essa mesma banda está ausente na linhagem mutante Δ*azf1*, indicando que a ORF de *azf1* foi deletada do genoma de *T. reesei*. Em paralelo, parental e mutante foram crescidos em glicerol e

celulose durante o período de 8, 12 e 24 horas e os RNAs dessas linhagens foram extraídos para análise de qRT-PCR. Reforçando o resultado obtido através da PCR convencional, não houve expressão do gene *azf1* de *T. reesei* em nenhum dos tempos analisados no $\Delta azf1$, contrastando com o encontrado para o parental cuja expressão máxima de *azf1* ocorreu após 12 horas de cultivo em presença de celulose (Figura 16B).

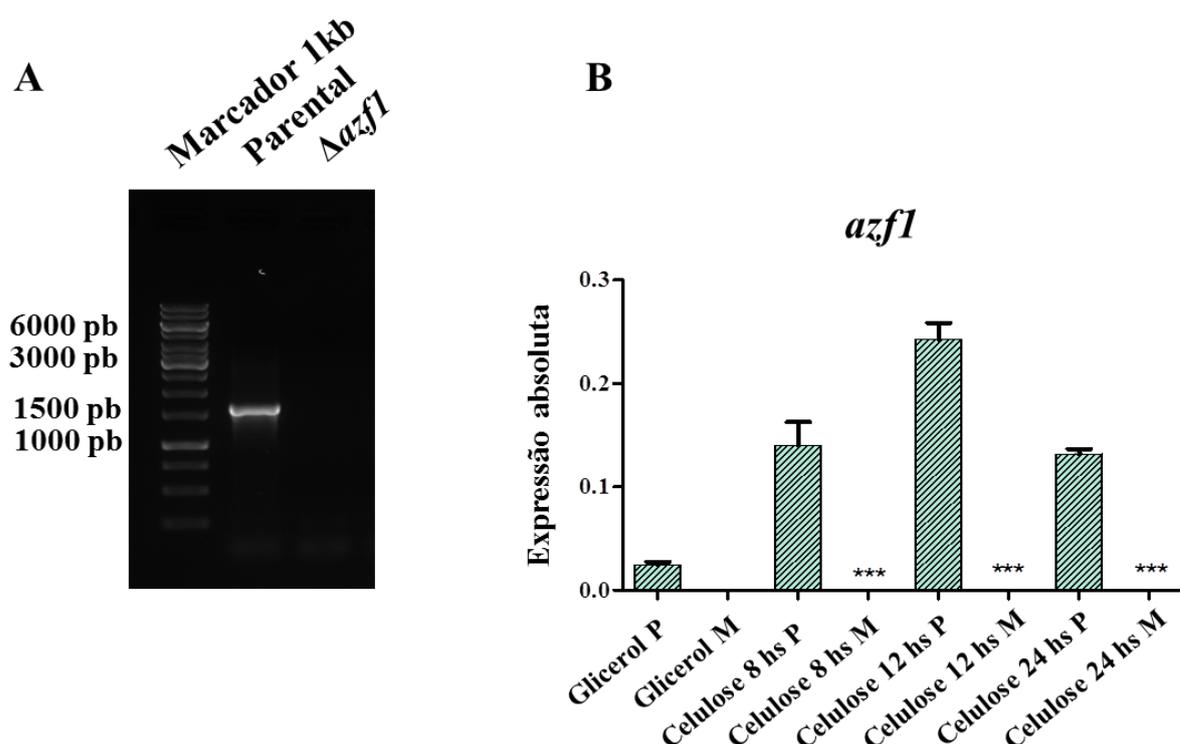


Figura 16. Confirmação da deleção do gene Tr103275 (*azf1*) por PCR. A) Amplificação das ORF do gene Tr103275 (1508 pb) apenas na linhagem parental. B) qRT-PCR mostrando que o gene *azf1* de *T. reesei* só é expresso na linhagem parental. P: parental; M: mutante.

A deleção de *azf1* na linhagem mutante foi confirmada por Southern blot, onde o DNA das linhagens parental e mutante $\Delta azf1$ foram digeridas com as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI*, originando fragmentos de 6189 e 2160 pares de base, respectivamente (Figura 17).

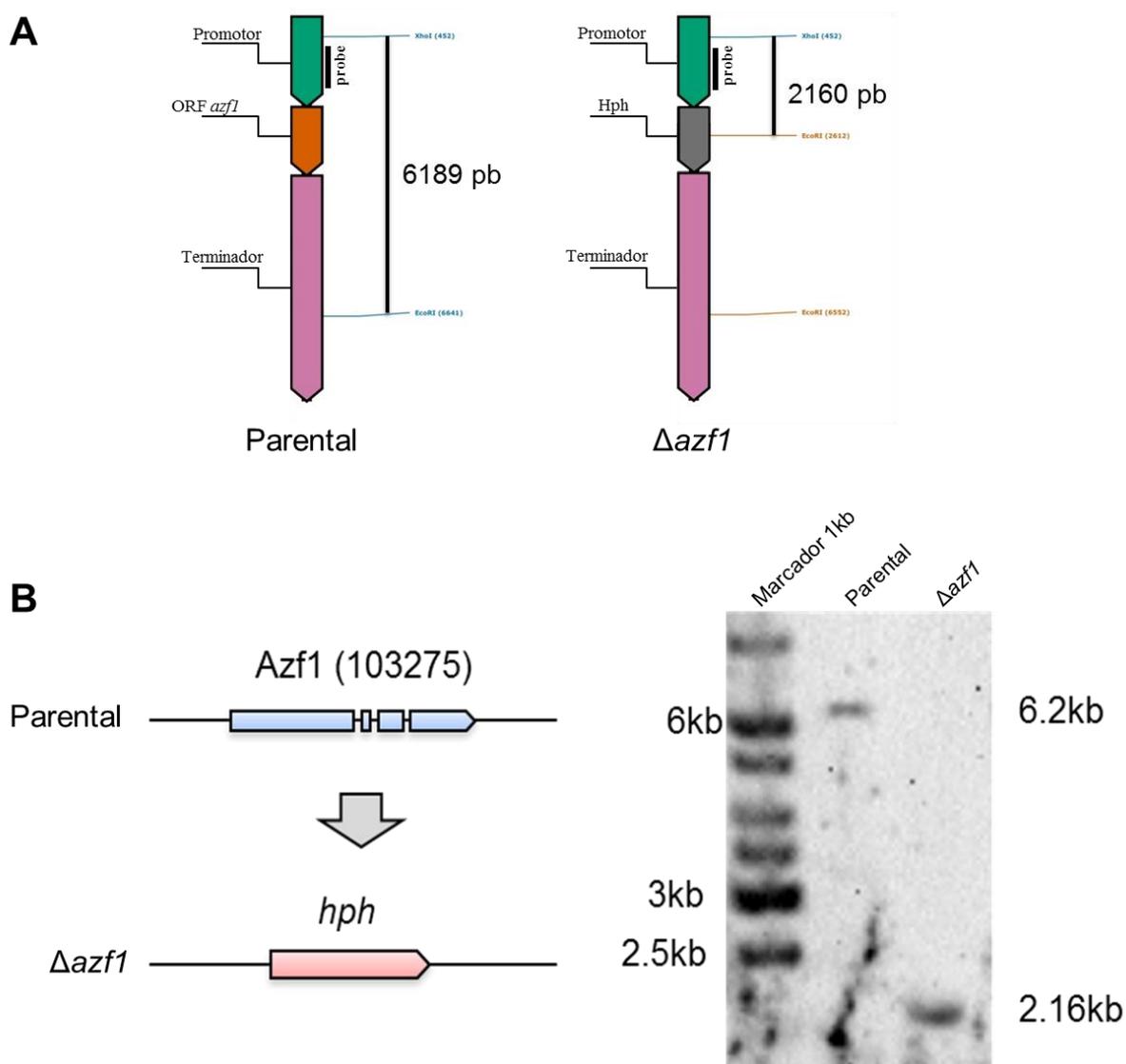


Figura 17. Estratégia de deleção e confirmação do mutante $\Delta azf1$. A) Para o southern blot, os DNAs das linhagens parental e mutante foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI, resultando em dois fragmentos de 6.2 kb e 2.16 kb, correspondentes às linhagens parental e mutante, respectivamente. B) A construção da linhagem mutante foi realizada substituindo a ORF do gene *azf1* (Tr103275) pelo gene de resistência à higomicina (*hph*). A análise de Southern blot confirmou a obtenção dos fragmentos esperados: 6.2 kb na linhagem parental e 2.16 kb no mutante $\Delta azf1$.

Uma vez que o gene *azf1* foi deletado com sucesso do genoma de *T. reesei*, nós demos início à caracterização da linhagem mutante $\Delta azf1$.

V. 8) O fator de transcrição Azf1 afeta o crescimento e esporulação em *T. reesei*

Para avaliar o papel de Azf1 no crescimento de *T. reesei*, as linhagens parental e $\Delta azf1$ foram incubadas em placas de cultivo contendo amido, celulose,

glicerol, glicose, lactose, PDA e sacarose, e o crescimento foi registrado em quatro e sete dias. Pouca ou nenhuma diferença fenotípica é notada nas fontes de carbono celulose, glicerol, lactose e sacarose, ao passo que em amido, glicose e PDA, diferenças no crescimento e coloração das hifas foram observadas ao final dos sete dias (Figura 18).

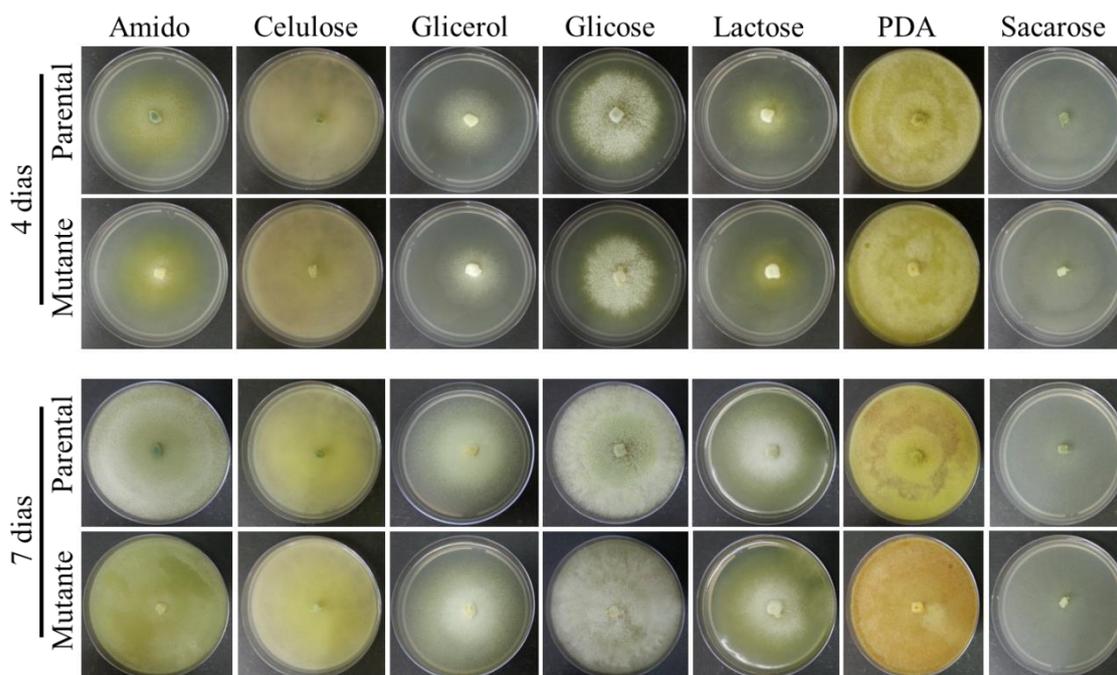


Figura 18. Azf1 está relacionado com o controle do crescimento em diferentes fontes de carbono. As linhagens parental e mutante $\Delta azf1$ foram cultivadas em placas de meio mínimo contendo 1% de amido, celulose, glicerol, glicose, lactose, sacarose e PDA. A incubação foi realizada a 28 °C e o crescimento foi registrado no quarto e sétimo dias.

O comportamento de $\Delta azf1$ em resposta às variações no pH ambiente também foi verificado e uma diferença notória no perfil de esporulação do mutante é observada principalmente em pH 11 (Figura 19), indicando que Azf1 pode estar relacionado a um processo de adaptação do fungo *T. reesei* em meio alcalino.

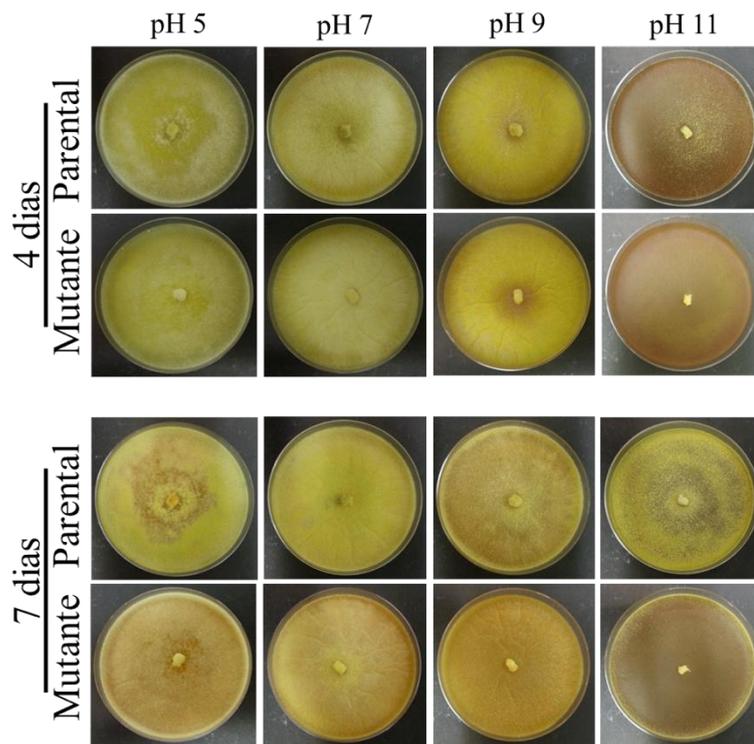


Figura 19. A deleção de *azf1* pode afetar o crescimento em resposta ao pH ambiente. As linhagens parental e mutante e $\Delta azf1$ foram cultivadas em placas de PDA com pH ajustado para 5,0, 7,0, 9,0 e 11,0. A incubação foi realizada a 28 °C e o crescimento foi registrado no quarto e sétimo dias.

Uma vez que uma diferença fenotípica foi mostrada entre as linhagens mutante e parental, nós avaliamos o papel de *Azf1* na esporulação de *T. reesei*. Durante 14 dias de crescimento em *race tubes*, foi possível observar claramente que o mutante $\Delta azf1$ produz menos esporos que o parental TU6_ $\Delta tku70$ (Figura 20).

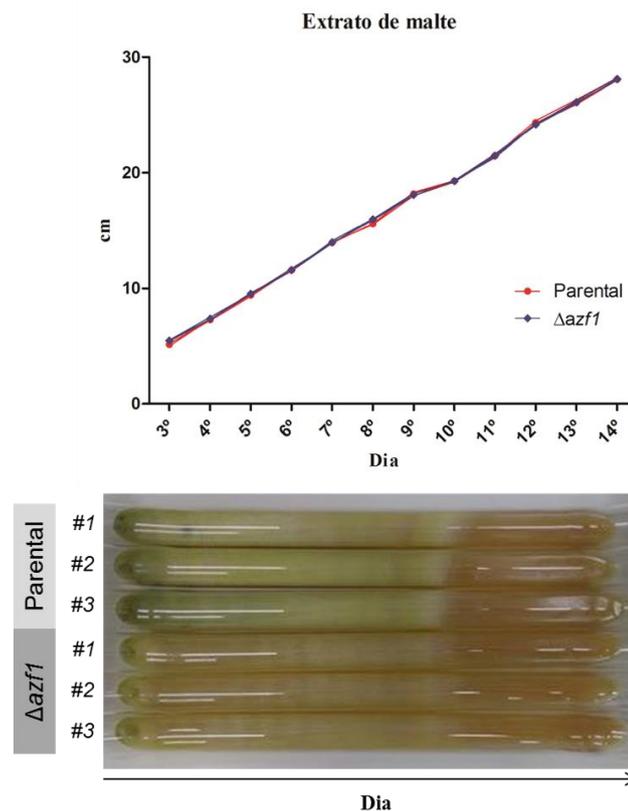


Figura 20. Crescimento das linhagens parental e $\Delta azf1$ em race tubes. O crescimento das duas linhagens foi observado durante 14 dias e mostrou-se semelhante. No entanto, elas mostraram um perfil de esporulação diferente, uma vez que o mutante esporulou menos que a linhagem parental.

A influência de Azf1 na esporulação foi confirmada por citometria de fluxo, uma vez que os esporos da linhagem mutante são menores do que os da linhagem parental (11,5% de esporos pequenos em $\Delta azf1$ e 4,7% de esporos em pequenos em TU6_ $\Delta ku70$) (Figura 21).

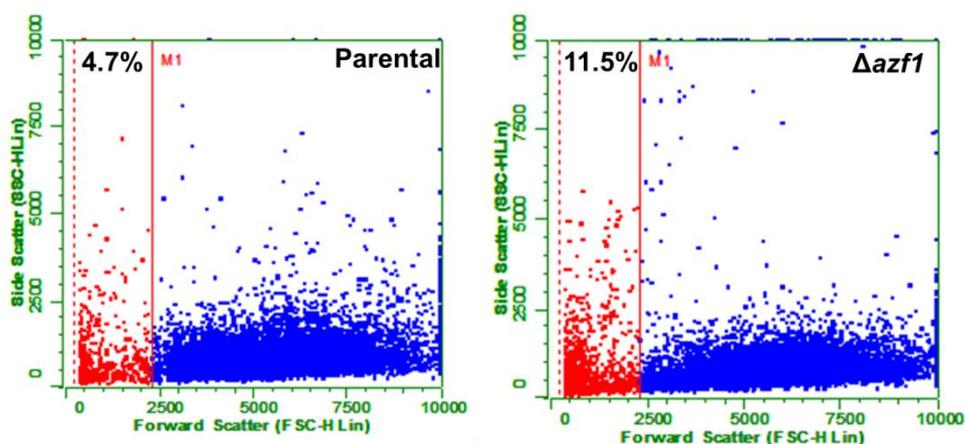


Figura 21. Azf1 está envolvido nos mecanismos de esporulação em *T. reesei*. Esporos da linhagem mutante são menores do que na linhagem parental (11,5% de esporos pequenos em $\Delta azf1$ e 4,7% de esporos em pequenos em TU6_ $\Delta ku70$).

V. 9) Azf1 não está envolvido no controle do ciclo celular em *T. reesei*

Trabalhos anteriores com *S. cerevisiae* mostraram que Azf1 pode participar do controle do ciclo celular, interagindo com a região promotora do gene que codifica a proteína CLN3, uma G1 ciclina, cuja expressão está diretamente relacionada à duração da fase G1 do ciclo celular. Nessa levedura, um aumento da expressão de CLN3 promovido pelo fator de transcrição Azf1 encurta a fase G1 do ciclo celular (Newcomb et al., 2002). Dessa forma, nós investigamos se homólogo de Azf1 de *T. reesei* também está envolvido na regulação do ciclo celular nesse fungo. Foi observado que, tanto na linhagem parental TU6_Δ*tku70*, quanto no mutante Δ*azf1*, a maioria das células encontra-se na fase G0/G1 (80,93% para o parental e 81,74% para o mutante). Menos de 0,2% do conteúdo de DNA corresponde à fase G2/M na linhagem parental e, no mutante, esse número é de apenas 0,01% (Figura 22).

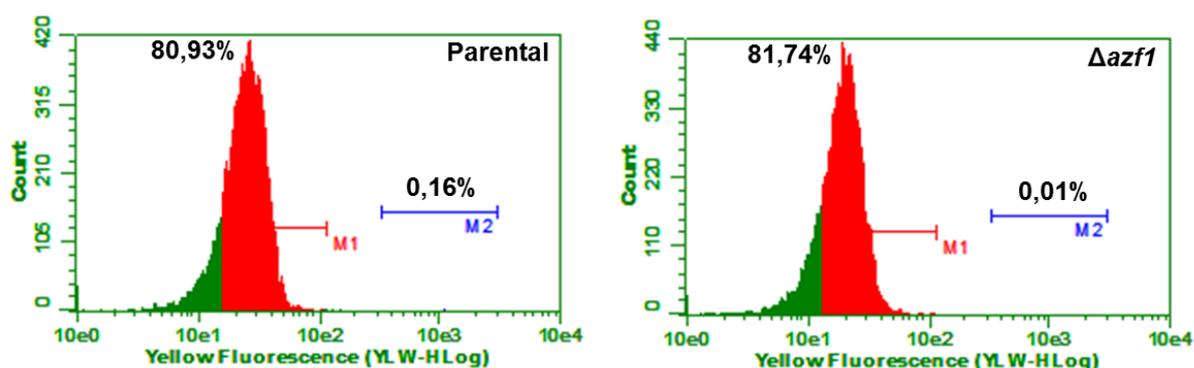


Figura 22. Análise da incorporação de iodeto de propídio (PI) pelas linhagens de *T. reesei* TU6_Δ*tku70* e Δ*azf1*. A fluorescência emitida pelo PI foi medida para 10 mil eventos (100%). As áreas M1 e M2 representam as células que se encontram nas fases G0/G1 e G2/M, respectivamente.

Esse perfil similar entre as duas linhagens analisadas mostra que a deleção de *azf1* em *T. reesei* não afetou a regulação do ciclo celular, como observado em *S. cerevisiae*.

V. 10) Azf1 é um regulador positivo da expressão de genes de celulases

Uma vez que nós detectamos um aumento na expressão de *azf1* nas fontes de carbono indutoras da produção de celulases em *T. reesei*, nós resolvemos verificar se esse fator de transcrição está envolvido na regulação da expressão de genes celulolíticos em celulose e bagaço de cana nas linhagens parental e Δ*azf1*. Inicialmente, nós medimos o peso seco do parental e mutante Δ*azf1* crescidos em

glicose por 24 horas e verificamos que não há diferença estatística no crescimento das duas linhagens, indicando que elas são comparáveis (Figura 23).

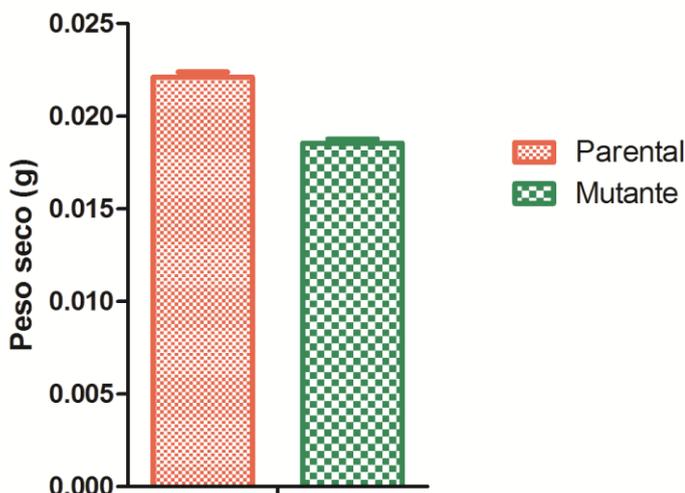


Figura 23. Peso seco das linhagens do parental e mutante $\Delta azf1$. Não houve diferença estatística no crescimento das duas linhagens, indicando que elas são comparáveis.

Em seguida, nós selecionamos um gene pertencente a cada um dos principais tipos de celulasas: *cel7a* (celobiohidrolase), *cel3a* (β -glicosidase) e *cel7b* (endoglicanase). Nós observamos que o comportamento dos três genes foi semelhante nas duas fontes de carbono e a expressão das celulasas atinge valor máximo no tempo de 8 horas. Entretanto, o mutante $\Delta azf1$ apresentou uma redução de quase duas vezes na expressão desses genes (Figura 24), sugerindo que o fator de transcrição Azf1 pode atuar como um regulador positivo da produção de celulasas.

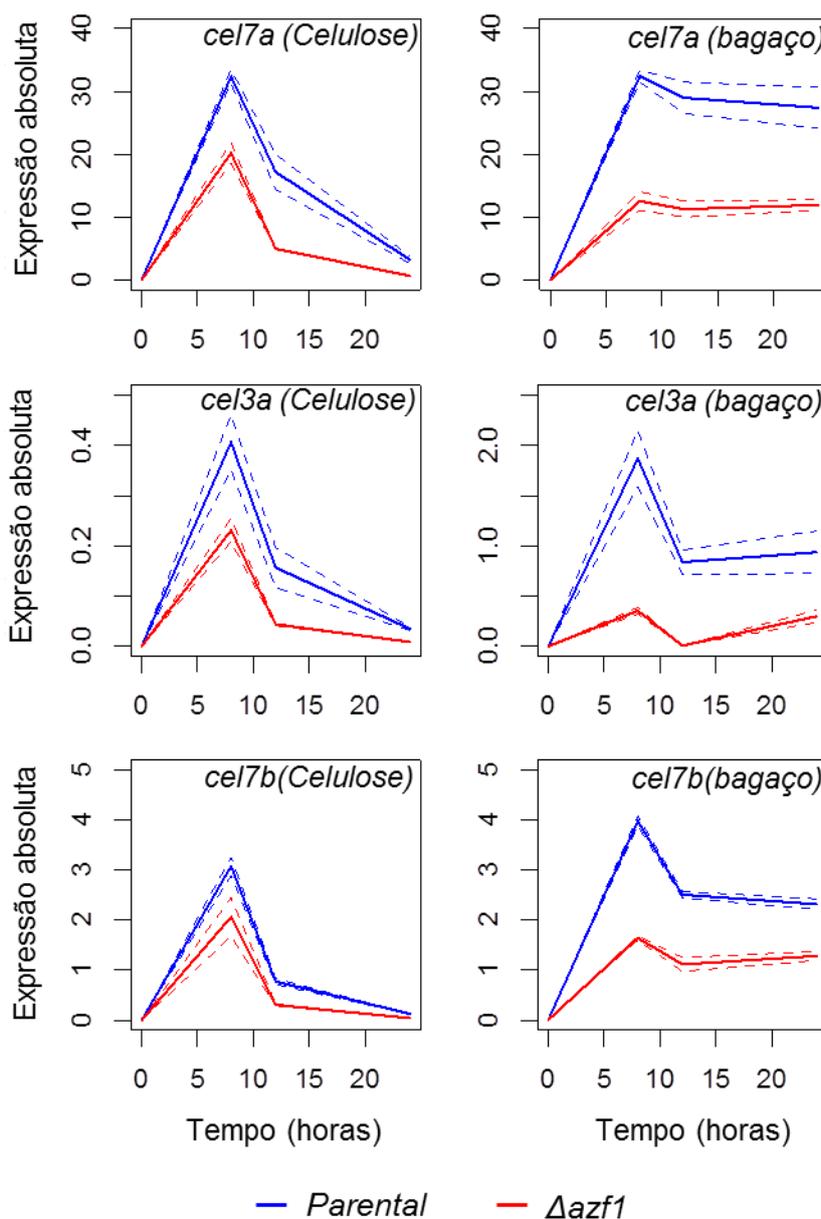


Figura 24. Os genes *cel7a*, *cel3a* e *cel7b* são afetados por *Azf1*. As linhagens parental e $\Delta azf1$ foram cultivadas na presença de celulose e bagaço de cana durante 8, 12 e 24 horas e a expressão dos genes *cel7a*, *cel3a* e *cel7b* foi avaliada por qRT-PCR.

Baseados nesses dados, nós fomos verificar o papel de *Azf1* na regulação de outras 14 celulases (totalizando 17 celulases), 4 xilanases e da proteína *swollenin*. Em presença de celulose, a deleção de *azf1* afeta negativamente a transcrição de pelo menos doze genes (*cel3b*, *swo*, *cel7a*, *cel6a*, *cel1a*, *cel61b*, *cel61a*, *cel5a*, *cel3a*, *cel7b*, *cel74a* e *cel12a*), sendo que nenhuma xilanase foi afetada por *Azf1* nessa fonte de carbono. O cultivo em bagaço de cana mostrou-se menos afetado por *Azf1* que celulose, uma vez que dez genes foram diferencialmente expressos na

linhagem mutante $\Delta azf1$ quando comparado ao parental. Desses dez genes, oito (*cel7a*, *swo*, *cel61a*, *cel6a*, *cel7b*, *cel5a*, *cel3a* e *xyn4*) foram positivamente regulados por Azf1 e dois (*cel1a* e *cel12a*), curiosamente, foram up-regulados no mutante ao final de 24 horas de cultivo (Figura 25).

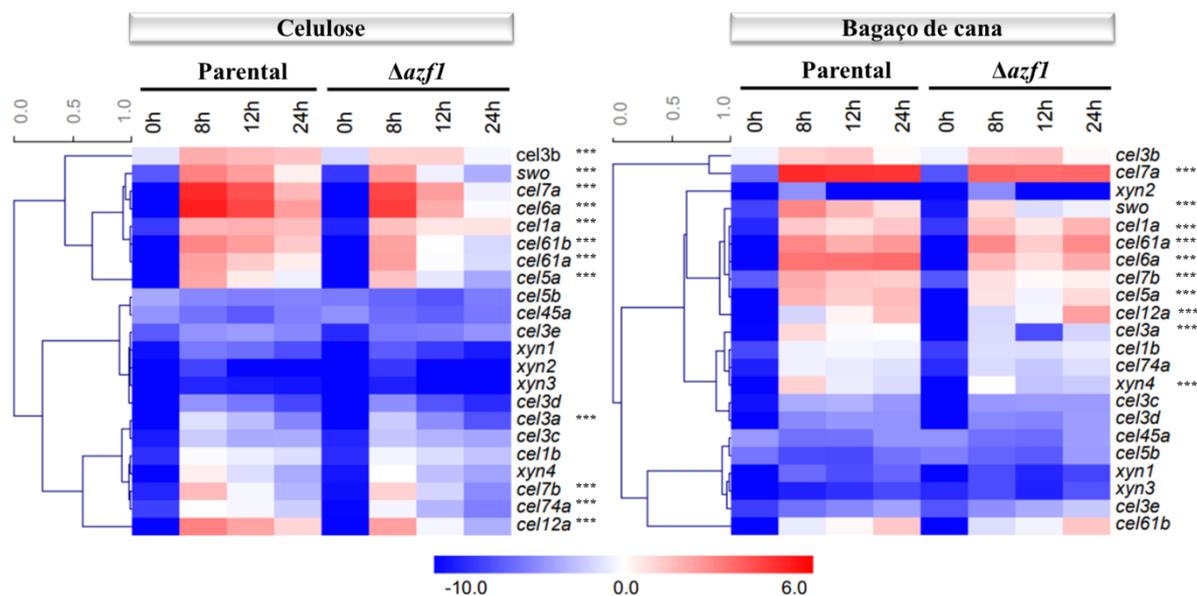


Figura 25. Genes celulolíticos e hemicelulolíticos estão sob controle de Azf1 em *T. reesei*. A expressão gênica de 17 celulasas, 4 xilanases e da proteína solenina foi avaliada após o cultivo de TU6_ $\Delta tku70$ e $\Delta azf1$ em presença de celulose e bagaço de cana durante 8, 12 e 24 horas. O software Mev 4.8.1 foi usado para a construção do *heat map*. Os valores de expressão gênica estão em log₂. Os asteriscos indicam que há diferença estatística entre parental e mutante em pelo menos um dos tempos analisados; ***P < 0.001.

Juntos, esses dados sugerem que o fator de transcrição Azf1 tem um papel importante na regulação do processo de degradação da biomassa vegetal, podendo atuar junto a outros fatores de transcrição como um regulador positivo da expressão gênica de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

V. 11) O motivo de ligação ao DNA de Azf1 foi predito através de análises de bioinformática

Azf1 de *T. reesei* é um fator de transcrição de 506 aminoácidos com quatro dedos de zinco em sua estrutura (Figura 26A). Para encontrar o motivo de ligação de DNA putativo para Azf1, foi utilizado o *software online* desenvolvido por Persikov e Singh (Persikov e Singh, 2013), em que os aminoácidos que compõem os dedos de zinco são o princípio para prever o reconhecimento da sequência de DNA. O motivo de ligação do DNA predito para Azf1 está descrito na Figura 26B.

A 001...MALAAQHTQ ADWGRWSHQI PQSFPMMGSP GFMSYDPRAQ DGSQMQRQVS AQYLVNSNYN...060
 061...QPPMPTASSP QYQHAGPFSY VPHYSPPPST PLGSPFKSEF PEHPLTRMTH STVDRHHSQA...120
 121...MRDYQPYSVP SRRGSISSVA TKPSAAPVTP GPTTPGSFTS SSDAQSPSTP NPQTASQPVS...180
 181...SKTLTYNETV HPGDRISFRT DVDELMKAIQ KTQTTEDECQQ TLIPARTPKN CTTSTPVLRT...240
 241...QSGKPRKQWV CDGPNCGKAF VQKTHRDIHR RHTTGHRPYV CTMENCGLTF SQRGNLKTHI...300
 301...RRHTGEKPFSS CAACGKCFQAQ RGNLRSHEET HKGLKPFVCR LDDCNKSFSSQ LGNMKTHQNN...360
 361...FHKEITLQKLT HMFVQFSENG EVPRDYQDLF EYFQKHYKNS NKGVKGRGKT RAVAARGPQD...420
 421...SAFRQAASPV PALLKTPATT HLPQMTMPAH DPHGRISPYA MTQGAANTLS NVLRNPNSY...480
 481...GLYGPTFAPG PVRDGVFHMGI IASHLS

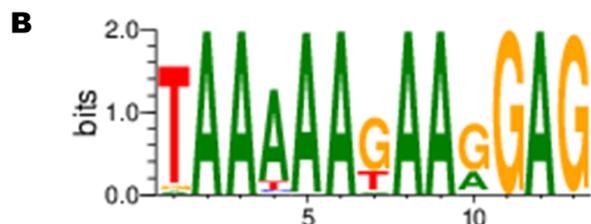


Figura 26. Azf1 é um fator de transcrição de 506 aminoácidos. A) Os quatro dedos de zinco presentes no Azf1 estão destacados em verde na sequência. B) Motivo de ligação ao DNA predito para Azf1.

Motivos individuais ocorridos nas sequências promotoras (1 kb) dos 13 genes celulolíticos regulados por Azf1 (ver seção V. 10) foram encontrados usando o software FIMO e as sequências de *cel7a* e *swo* (Tabela 6) foram selecionadas para a análise de SPR.

V. 12) O motivo dedo de zinco de Azf1 recombinante foi produzido por expressão heteróloga em *E. coli*

V. 12. 1) Azf1 é expresso em *E. coli* na fração solúvel

Para testar as condições ideais de expressão do dedo de zinco de Azf1 em *E. coli* foram utilizadas duas temperaturas de cultivo, 25 °C e 30° C, e quatro concentrações de sal no tampão de lise (150 mM, 250 mM, 500 mM e 700 mM de NaCl). Nós observamos que a maior parte do complexo (GST fusionada à TrAzf1234-370) aparece na fração solúvel à temperatura de 25 °C. Em relação à concentração de sal, quantidades mínimas de NaCl (150 mM) foram suficientes para manter a proteína na fração solúvel de *E. coli* (Figura 27).

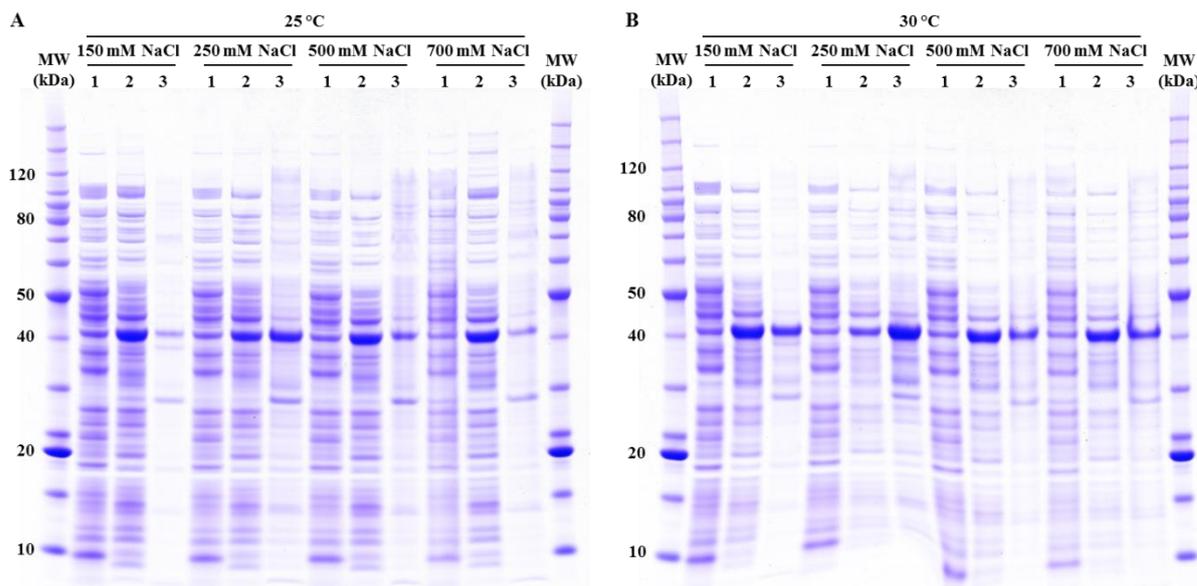


Figura 27. SDS-PAGE gel mostrando a expressão do complexo (GST fusionada à TrAzf1234-370) sob diferentes condições. Os números 1, 2 e 3 correspondem a: (1) fração solúvel em LB (controle); (2) fração solúvel em TB e (3) fração insolúvel em TB. A) Indução a 25 °C. B) Indução a 30 °C. A proteína de fusão aparece a aproximadamente 40 kDa.

Desta forma, escolhemos como parâmetros a temperatura de 25 °C e 150 mM de NaCl para a expressão solúvel do complexo proteico.

V. 12. 2) A proteína pura foi obtida após quatro etapas de purificação

Após 24 horas de crescimento em meio TB, o dedo de zinco de Azf1 fusionado a GST foi produzido por indução em *E. coli* BL21 (DE3). Foram obtidos 25,0 gramas de células e os extratos celulares foram preparados e aplicados em uma coluna GSH Sepharose 4FF. No lisado total é possível observar o complexo dedo de zinco de Azf1-GST com aproximadamente 40 kDa (Figura 28). A fração eluída foi tratada com TEV por 48 horas resultando na clivagem completa do complexo. Ao fim das três etapas de purificação seguintes, a *tag* de GST e o dedo de zinco de Azf1 puro foram obtidos e possuem aproximadamente 26 e 19 kDa, respectivamente (Figura 28).

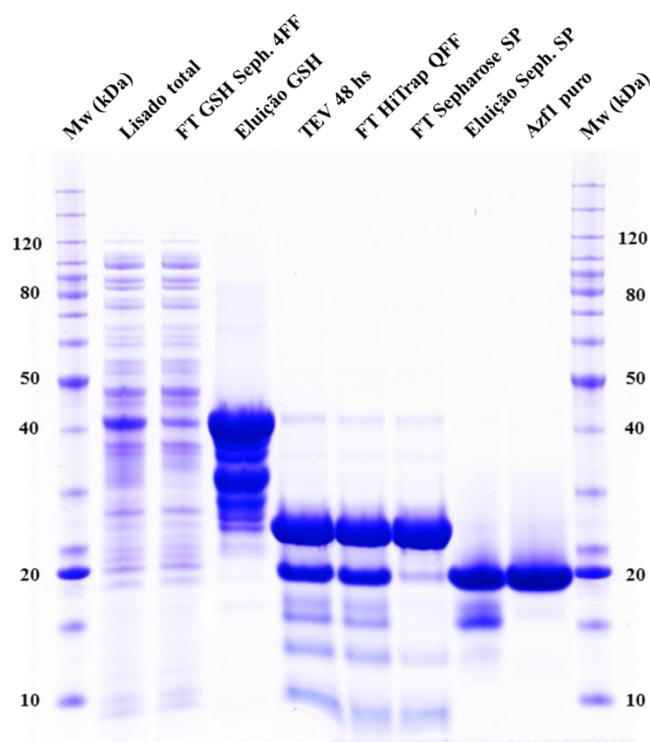


Figura 28. A proteína pura foi obtida após quatro etapas de purificação. O gel SDS-PAGE mostra os principais resultados da purificação de dedo de zinco de Azf1: o lisado total antes da purificação da proteína (linha 2), o *flowthrough* da coluna GSH Sepharose 4FF (linha 3) e o complexo dedo de zinco de Azf1-GST após a eluição com GSH (linha 4), o produto da clivagem com TEV (linha 5), o *flowthrough* da coluna HiTrap QFF (linha 6), a GST no *flowthrough* da coluna SP Sepharose (linha 7), a fração eluída da coluna de SP Sepharose (linha 8) e a proteína pura após a cromatografia de exclusão molecular (linha 9). FT: *flowthrough*.

A pureza de Azf1 foi confirmada medindo-se os espectros de absorção na faixa de 550 a 250 nm. Um único pico foi obtido com absorção máxima a 280 nm, confirmando a pureza da amostra. Neste comprimento de onda, a absorção de proteínas ocorre principalmente devido à concentração de aminoácidos contendo cadeias laterais aromáticas: triptofano, tirosina e cisteína. A concentração da proteína foi determinada utilizando o coeficiente de absorção molar (ϵ) e a lei Lambert-Beer (Pace et al., 1995), atingindo um valor de 115,35 μ M. Nos próximos passos, o dedo de zinco de Azf1 puro foi utilizado nas análises de SPR.

V. 13) Investigação do motivo de ligação de Azf1 por SPR

V. 13. 1) Interação da proteína com o DNA dupla-fita

Para determinar se Azf1 reconhece o motivo de ligação no DNA predito através da análise de bioinformática, nós expressamos e purificamos o domínio

dedo de zinco de Azf1 em *E. coli* e realizamos o ensaio de SPR. As interações em tempo real foram medidas com o sistema BIAcore T-200 usando um chip CM3. Inicialmente, nós ligamos covalentemente a estreptavidina ao chip CM3. Este chip é composto por quatro *flow cells*. A primeira delas é a referência, ou seja, não há DNA ligado em sua superfície. Os DNAs dupla-fita biotinizados correspondentes aos promotores de *cel7a* e *swo* foram imobilizados nas *flow cells* dois e três, respectivamente. A última *flow cells* foi imobilizada com um DNA dupla-fita correspondente ao motivo de ligação para o complexo de ligação à CCAAT (CBC) heterotrimérico de *A. nidulans* (Tabela 6). Desta forma, nenhuma ligação específica para Azf1 é esperada na última *flow cell*.

A capacidade de ligação da superfície do chip depende do nível de ligante imobilizado. A quantidade apropriada de DNA necessária para uma capacidade máxima de ligação de Azf1 (R_{max}) de 100 RU foi calculada de acordo com a Equação 1: $R_L = Mw_{Ligante} / Mw_{Analito} \times R_{max}$. Nessa fórmula, R_L é a quantidade de ligante imobilizado em RU, Mw é o peso molecular (do inglês, *molecular weight*) do ligante ou analito e R_{max} descreve a capacidade máxima de ligação da superfície do ligante pelo analito, em RU. Um resumo dos cálculos usados para imobilização do DNA nas *flow cells* está descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Resumo dos cálculos utilizados na imobilização do DNA, mostrando o peso molecular do ligante (Mw), R_{max} , R_L e o volume de DNA injetado nas *flow cells*.

<i>Flow cell</i>	DNA	Mw DNA (Da)	R_{max} (RU)	R_L (RU)	RU ligado	DNA 2.5 nM injetado (μ l)
2	Trcel7a-611-25	15758	100	99,99	100,2	75
3	Trswo1-951-25	15765	100	100,03	99,9	60
4	AncccAp-379-25	15764	100	100,03	102,3	42

Os cálculos foram realizados considerando o peso molecular do analito Azf1 de 15759,98 Daltons.

Uma vez que todos os DNA foram imobilizados em suas respectivas *flow cells*, nós avaliamos a interação da proteína com os DNAs dupla-fita por SPR. Sete concentrações do analito foram preparadas num intervalo de 200 nM a 3.125 nM. Os resultados obtidos para as quatro *flow cells* são mostrados nos sensogramas da Figura 29. O sensograma é um gráfico de resposta em função do tempo, mostrando

o progresso da interação proteína-DNA. Nesta análise, os primeiros 200 segundos representam o tempo de associação do ligante (DNA dupla-fita) ao analito (Azf1), enquanto os últimos 400 segundos mostram a dissociação do complexo.

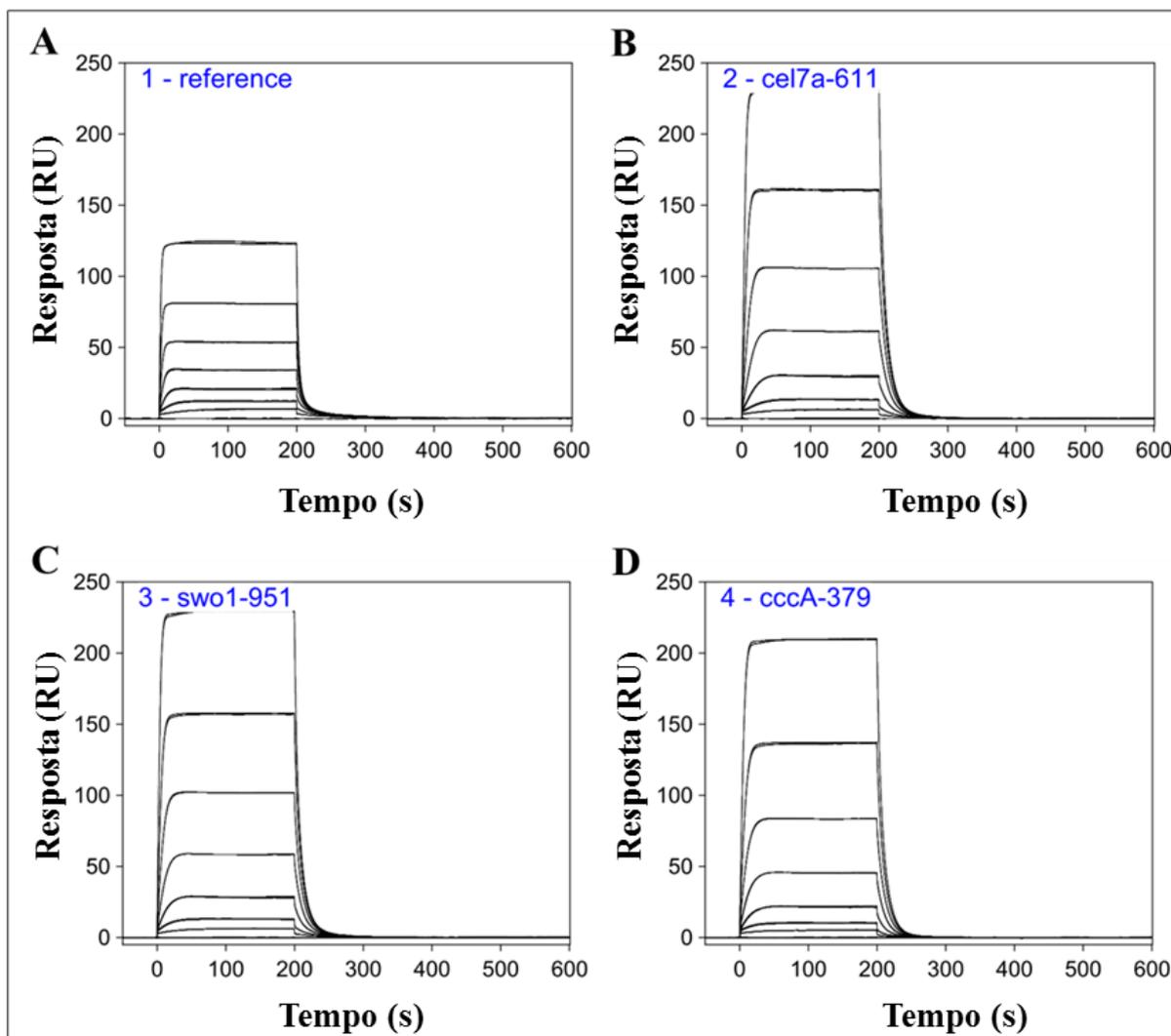


Figura 29. Sensogramas mostrando a cinética da interação para as sete concentrações de Azf1 e os DNAs dupla-fita. A) *Flow cell* de referência (sem DNA). B) *cel7a*. C) *swo*. D) sítio de ligação de CBC.

Conforme esperado, uma resposta máxima foi observada na maior concentração do analito em todas as *flow cells*. No entanto, houve ligação não específica na *flow cell* de referência (Figura 29A), indicando uma possível interação entre o dedo de zinco de Azf1 e a matriz de dextrana do chip ou a superfície de estreptavidina. Ligação não específica também foi encontrada na última *flow cell* (Figura 29D), sugerindo que Azf1 está ligando de forma não específica ao DNA correspondente ao sítio de ligação de CBC. Nas *flow cells* correspondentes à *cel7a*

e *swo*, foi encontrada uma resposta de aproximadamente 250 RU (Figuras 29B e 29C).

V. 13. 2) Análise de cinética e afinidade

Em um experimento de SPR típico, há uma reação direta (associação) e reversa (dissociação) para o complexo ligante-analito. Os parâmetros cinéticos fornecem informações sobre a “rapidez” com que as interações acontecem. A constante da taxa de associação, k_a ($M^{-1}s^{-1}$), indica o número de complexos formados por segundo em uma solução de 1 molar e a constante da taxa de dissociação, k_d (s^{-1}), corresponde à fração de complexos que se desintegram por segundo. A afinidade determina o quanto de complexos ligante-analito são formados no equilíbrio (quando a associação está em equilíbrio com a dissociação). A dependência entre os parâmetros cinéticos e de afinidade é mostrada pela constante de dissociação no equilíbrio (K_D), que corresponde a k_d/k_a . Quanto menor o valor K_D , maior a afinidade de ligação entre o ligante e seu alvo (Ritzefeld e Sewald, 2012).

A Figura 30 mostra os sensogramas correspondentes à cinética (lado esquerda) e à afinidade no estado estacionário (lado direito) após a subtração da resposta da *flow cell* de referência. Os valores de K_D para as análises de cinética entre o complexo formado por Azf1 e os DNAs analisados foram de 146,3 nM, 170,5 nM e 466 nM, para *cel7a*, *swo* e o sítio de ligação de CBC, respectivamente. A partir dos resultados de afinidade no estado estacionário, *cel7a*, *swo* e o sítio de ligação de CBC apresentaram um K_D de 147 nM, 172 nM e 460 nM, respectivamente. De acordo com estes valores, *cel7a* e *swo* tiveram uma maior afinidade ao dedo de zinco de Azf1 em comparação com a região promotora onde se encontra o sítio de ligação de CBC. No entanto, outras análises devem ser feitas para validar esses dados, uma vez que houve interação não específica na *flow cell* de referência e no controle negativo (sítio de ligação de CBC).

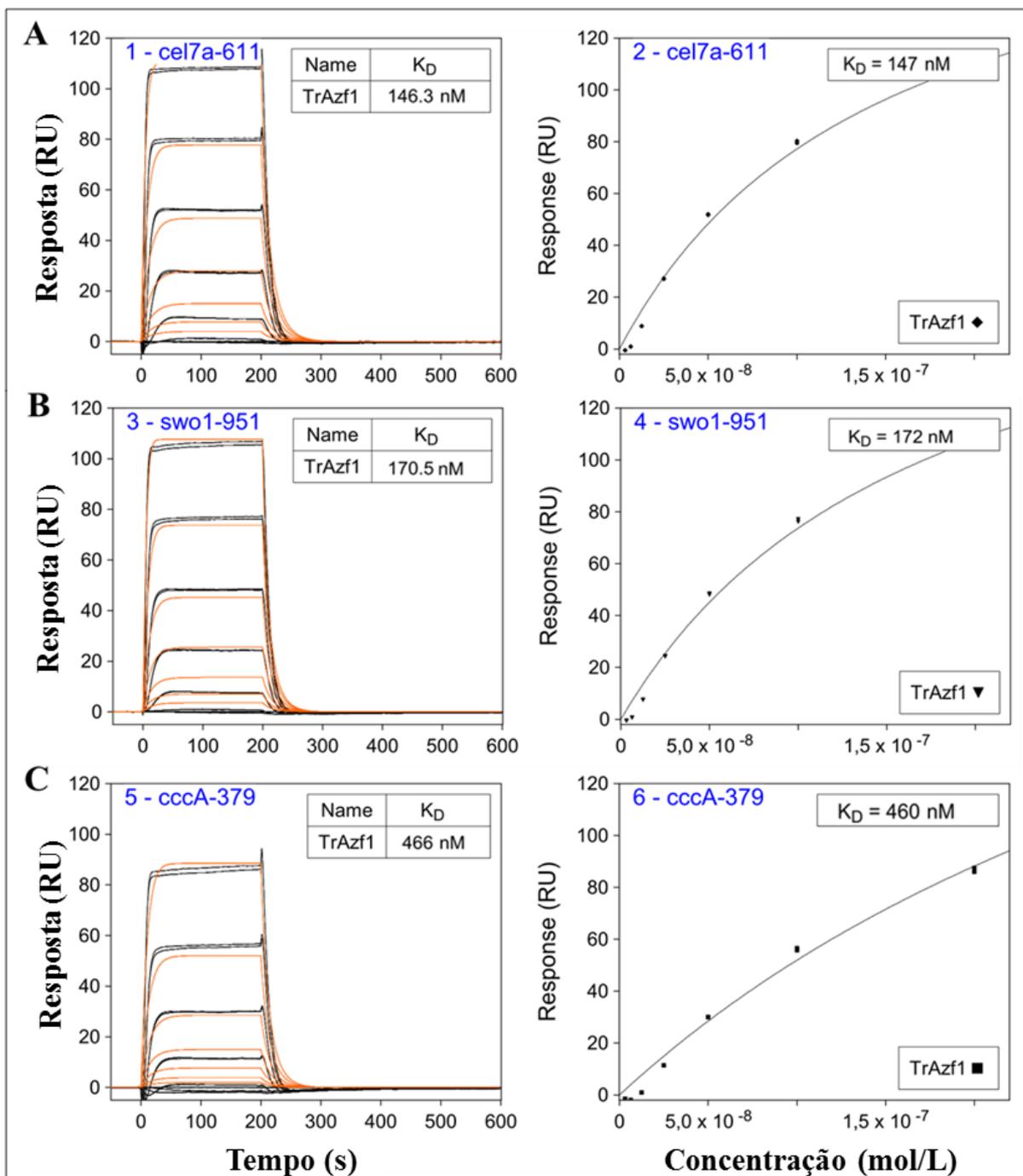


Figure 30. Sensogramas correspondentes à cinética (esquerda) e afinidade no estado estacionário (direita) do complexo Azf1-DNA após a subtração da *flow cell* de referências. A) *cel7a*. B) *swo*. C) sítio de ligação de CBC.

V. 13. 3) Lidando com a ligação não específica

Interações não específicas podem ocorrer quando o analito interage com a superfície do chip e pode ser verificada através da resposta obtida na *flow cell* de referência. No nosso experimento de SPR, nós observamos que houve ligação não específica de Azf1 à superfície do chip onde se encontra a *flow cell* de referência e

também no controle negativo, onde está imobilizado o DNA correspondente ao sítio de ligação de CBC, que não é um alvo de Azf1. Para contornar esse problema, nós realizamos um ensaio em que diferentes concentrações do competidor não específico Pdlc (5, 10, 15, 20 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionadas às amostras contendo 200 nM of Azf1. A Figura 31 mostra o efeito da adição Pdlc na cinética de formação e dissociação do complexo Azf1-DNA. Como pode ser observado, a concentração mínima de Pdlc (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diminuiu drasticamente a ligação de Azf1 às regiões promotoras de *cel7a* e *swo* (Figura 31B e 31C). O mesmo efeito foi observado para o sítio de ligação de CBC que não é um alvo esperado para Azf1 (Figura 31D).

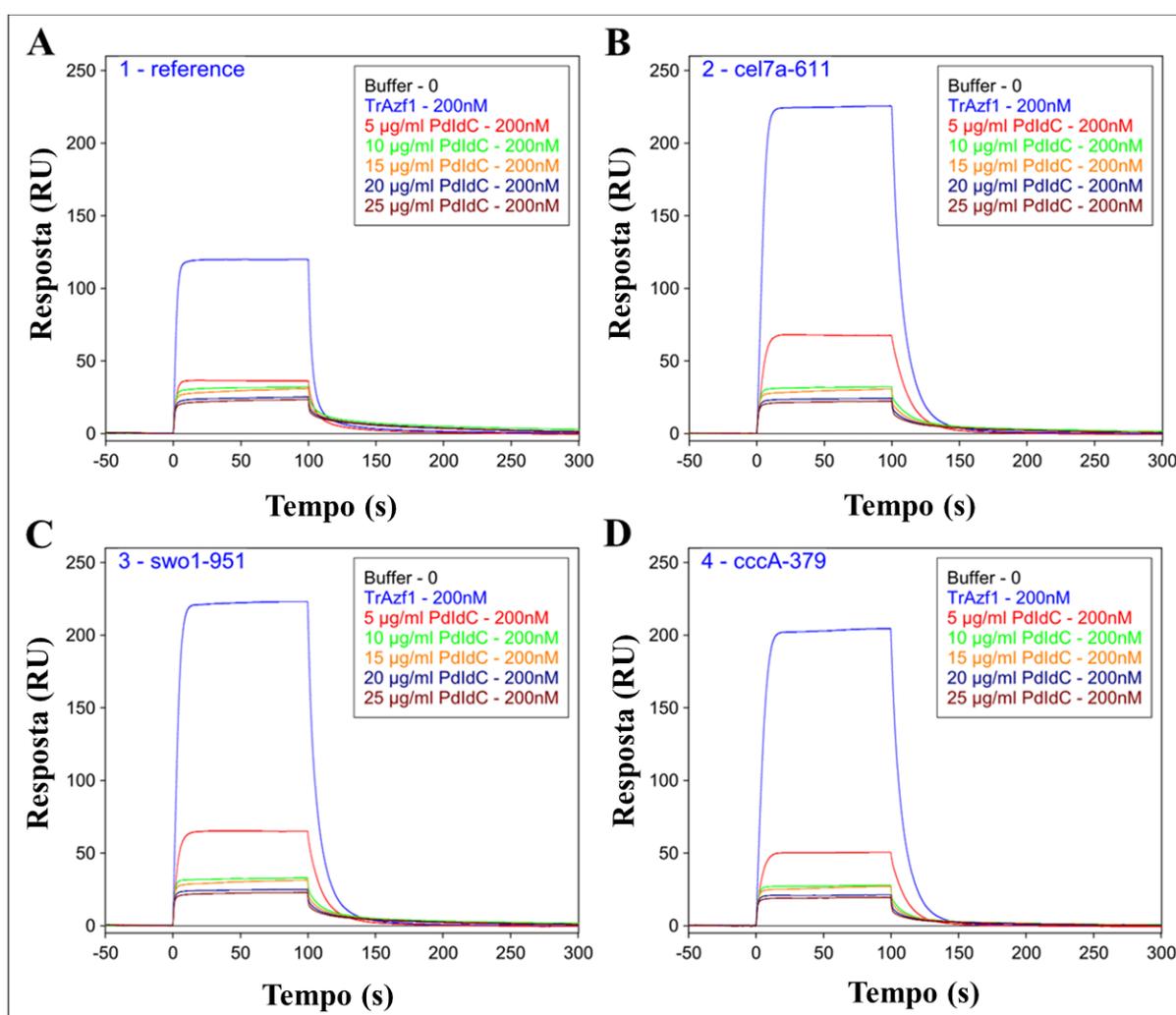


Figura 31. Sensogramas mostrando a cinética de interação entre Azf1 (200 nM) e os DNAs dupla-fita após a adição de Pdlc. Nesse ensaio, diferentes concentrações do competidor não específico Pdlc foram utilizadas: 5, 10, 15, 20 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A) *Flow cell* de referência (sem DNA). B) *cel7a*. C) *swo*. D) sítio de ligação de CBC.

Em conjunto, esses resultados sugerem que as sequências de DNA correspondentes aos promotores de *cel7a* e *swo* preditos através da análise de bioinformática apresentaram maior afinidade de ligação ao fator de transcrição Azf1 em comparação com o controle negativo, correspondente ao sítio de ligação de CBC. No entanto, outras abordagens são necessárias para confirmar o motivo de ligação de Azf1 em *T. reesei*, uma vez que ligações inespecíficas foram detectadas durante o ensaio de SPR.

Discussão

VI) DISCUSSÃO

O mecanismo de produção de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal por *T. reesei* requer uma regulação orquestrada que é dependente da atuação de diversos fatores de transcrição. Por ser uma espécie saprofítica e vastamente distribuída no ambiente, *T. reesei* criou meios de reconhecer os nutrientes disponíveis e assim captá-los de forma eficiente, sem desperdício energético. Nesse sentido, as proteínas reguladoras da expressão gênica têm papel fundamental.

O fator de transcrição Azf1 de *T. reesei*, aqui denominado TrAzf1, mostrou ser altamente expresso na presença de fontes de carbono mais complexas, como a celulose e o bagaço de cana de açúcar. Esses dados sugerem que essa proteína pode atuar como um regulador positivo no processo de desconstrução da lignocelulose. A repressão da expressão desse mesmo gene em presença de glicose indica que *T. reesei* é sensível à presença de fontes de carbono prontamente metabolizáveis e, dessa forma, o gene *azf1* é inibido, semelhante ao que ocorre com outros fatores de transcrição que regulam positivamente a produção das holocelulases. Condizente com o que encontramos nesse trabalho, dos Santos Castro e colaboradores mostraram, em 2014, que durante o crescimento da linhagem QM9414 de *T. reesei* em celulose, *azf1* é quase oito vezes mais expresso nessa condição em comparação à glicose. Em soforose, a principal fonte de carbono indutora da produção de celulasas (Gritzali e Brown, 1983; Sternberg e Mandels, 1979), *azf1* é seis vezes mais expresso que em glicose. Desse modo, TrAzf1 é um alvo em potencial do mecanismo de CCR em *T. reesei*, similar ao que ocorre com o regulador positivo XYR1 (dos Santos Castro et al., 2014). Diferente do que encontramos, Slattery e colaboradores demonstraram, em 2006, que há um aumento da expressão de *azf1* em presença de glicose na levedura *S. cerevisiae*, sugerindo que os homólogos desse fator de transcrição podem se comportar de maneira diversificada entre as espécies (Slattery et al., 2006). Essa informação é, contudo, paradoxal. Isso porque um trabalho desenvolvido anteriormente por Stein e colaboradores, em 1998 (Stein et al., 1998), mostrou que a expressão de *azf1* em *S. cerevisiae* ocorre preferencialmente em fontes de carbono não fermentáveis, tal como o glicerol. Nesse estudo, a expressão do gene *azf1* foi indetectável em

presença de glicose, contrastando com os achados mais recentes. No presente trabalho, nós verificamos que, em *T. reesei*, a expressão gênica de *azf1* é aumentada quando o fungo utiliza glicerol como fonte de carbono, em comparação à glicose, corroborando com os achados de Stein e colaboradores. Ainda na levedura *S. cerevisiae*, Newcomb e colaboradores mostraram, em 2002, que em o fator de transcrição Azf1 está envolvido na regulação positiva do gene *cln3*, cuja expressão está diretamente relacionada com a duração da fase G1 do ciclo celular (Newcomb et al., 2002). Entretanto, a deleção do homólogo de *azf1* em *T. reesei* não provocou alterações no ciclo celular dessa espécie, sugerindo que TrAzf1 pode ter, em *T. reesei*, um papel diferente do que exerce na levedura *S. cerevisiae*.

TrAzf1 atua como um regulador positivo da expressão de genes holocelulolíticos. Em *T. reesei*, diversos fatores de transcrição atuam em conjunto para se alcançar uma regulação efetiva da degradação da parede celular vegetal. XYR1 continua a ser o regulador mestre da expressão da celulase em *T. reesei* (dos Santos Castro et al., 2016). Homólogos desta proteína desempenham um papel similar em outros organismos produtores de celulase como *A. niger* e *N. crassa*. Em *N. crassa*, XLR-1, CLR-1 e CLR-2 foram identificados como proteínas chave na regulação da degradação da biomassa da planta em resposta à presença de açúcares solúveis (Craig et al., 2015). O homólogo de XYR1 em *A. niger*, XlnR, regula principalmente a expressão de genes relacionados à degradação do polissacarídeo xilana, mas também pode regular a expressão de alguns genes celulolíticos (Hasper et al., 2000). Além de XYR1, outros fatores de transcrição atuam como reguladores positivos na regulação da expressão de celulases em *T. reesei*, como o ACEII, ACEIII, LAE1, VELVET, BglR e o complexo de HAP2/3/5 (Gupta et al., 2016; Hakkinen et al., 2014). Dessa forma, nós acreditamos que TrAzf1 atua juntamente com esses reguladores para uma degradação eficiente do polímero de celulose. Análises filogenéticas mostram que *T. reesei* compartilha grande parte de seu proteoma, incluindo fatores de transcrição, com outras espécies bem estudadas em relação à degradação da biomassa celulósica: *N. crassa*, *A. niger*, *A. nidulans* e *P. chrysogenum* (Gupta et al., 2016). Contudo, apesar da grande similaridade entre essas espécies, não há relatos da participação de fatores de transcrição homólogos ao Azf1 na regulação da degradação da biomassa vegetal nesses outros fungos filamentosos.

Um grande número de genes que codificam para CAZymes se mostrou regulado por TrAzf1 durante o crescimento em celulose e bagaço de cana, dentre eles, pelo menos treze celulasas incluindo a *cel7a*, a principal celulase secretada por esse fungo. Das quatro xilanases analisadas, apenas o gene *xyn4* foi *down* regulado no mutante $\Delta azf1$ em presença de bagaço de cana. Tais dados sugerem que o homólogo ao Azf1 de *T. reesei* atua principalmente na regulação da utilização da celulose cristalina, ao invés de polímeros amorfos como a hemicelulose. A *swollenin*, uma proteína que auxilia as celulasas tradicionais na degradação da celulose (Andberg et al., 2015), também teve sua expressão gênica regulada positivamente por TrAzf1. De modo similar, o gene AS6577, homólogo da *swollenin* em *T. reesei*, também foi altamente expresso durante o crescimento em celulose no fungo celulolítico *Ascocoryne sarcoides* (Gianoulis et al., 2012). Esse dado sugere a existência de um possível homólogo de Azf1 nessa espécie que também pode estar envolvido com a regulação da expressão gênica do gene *swo*. Outro indício da participação de homólogos de Azf1 na degradação de polissacarídeos vegetais foi demonstrado no trabalho de Mathioni e colaboradores, em 2013 (Cramer et al., 2013). Durante a infecção, o fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae* produz enzimas hidrolíticas que atuam sobre a parede celular da planta. Nesse estudo, genes que codificam as proteínas Alfa-N-arabinofuranosidase A, lactose permease e uma glicosil hidrolase da família 5 possuem, em sua região promotora, um motivo de ligação para o homólogo do fator de transcrição Azf1 de *S. cerevisiae*, indicando que Azf1 pode ter um papel no mecanismo de desconstrução da parede celular vegetal em *M. oryzae*.

Além das celulasas tradicionais, nossos dados sugerem que Azf1 pode atuar na regulação da degradação oxidativa da celulose. Em *Fusarium graminearum*, foi demonstrado que o homólogo de Azf1 se mostrou potencialmente envolvido na regulação da expressão de genes bacterianos conhecidos como MAMPs (do inglês, *microbe-associated molecular pattern*) que estão envolvidos com o desencadeamento da resposta imunológica. O fungo reconhece esses MAMPs e responde com um aumento na captação de ferro (Ipcho et al., 2016). Em *T. reesei*, o ferro pode participar do mecanismo oxidativo de degradação da celulose, atuando como aceptor final de elétrons para a enzima celobiose-desidrogenase (CDH, enzima a qual *T. reesei* tem possíveis candidatas) que oxida o dissacarídeo

celobiose e outros oligossacarídeos. Através da reação de Fenton, a redução de Fe^{3+} à Fe^{2+} pode gerar radicais hidroxila, auxiliando o processo de despolimerização dos polissacarídeos que constituem a parede celular (Aguiar e Ferraz, 2011; Mansfield et al., 1997). Estudos recentes demonstraram que as LPMOs atuam em conjunto com as CDHs para aumentar a conversão da celulose em monômeros de glicose (Beeson et al., 2011; Harris et al., 2010). Em nossos resultados, o gene que codifica a LPMO, *cel61a*, foi *down* regulado no mutante $\Delta azf1$ em celulose e bagaço de cana. Dessa forma, sugere-se que TrAzf1, similar ao que ocorre em *F. graminearum*, também pode estar envolvido com o metabolismo oxidativo em *T. reesei* e assim contribuir para a desconstrução da biomassa vegetal.

Além do papel regular do de TrAzf1 na produção de celulases, nós vimos que a deleção de *azf1* em *T. reesei* afeta diretamente o desenvolvimento desse fungo, provocando uma redução do número e tamanho dos esporos produzidos pela linhagem mutante $\Delta azf1$. Uma alteração do crescimento em resposta à deleção de *azf1* também foi observada em *S. cerevisiae* cultivada em fontes de carbono não fermentáveis. Nessa levedura, o mutante $\Delta azf1$ apresentou uma redução modesta no crescimento a 30 °C, sendo que esse efeito se pronunciou quando a temperatura foi elevada para 37 °C (Slattery et al., 2006). Nós já relatamos previamente que o fungo fitopatogênico *M. oryzae* possui enzimas hidrolíticas que apresentam, nas regiões promotoras de seus genes, motivos de ligação para Azf1 (Cramer et al., 2013). Em outro trabalho de Xiaoyu e colaboradores, publicado em 2013, eles demonstraram que o fator de transcrição COS1 de *M. oryzae* é um homólogo do Azf1 de *S. cerevisiae* (Li et al., 2013). COS1, por sua vez, está envolvido no desenvolvimento de conidióforos em *M. oryzae* e uma mutação nesse regulador provoca resulta em uma conidiação defeituosa (Zhou et al., 2009). Além de regular o desenvolvimento dos conidióforos, COS1 pode modular a expressão de genes pertencentes a diversas categorias funcionais baseadas no *gene ontology* (GO) como transportadores, metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, ligação a íons metálicos e atividade de oxidorreductase (Li et al., 2013). Em *T. reesei*, já é sabido que a proteína VEL1 está envolvida com a regulação do crescimento dessa espécie. A deleção de *vel1* resulta em diminuição da conidiação, impede a formação do peritécio e altera a morfologia da hifa reduzindo, conseqüentemente, a taxa de crescimento (Karimi Aghcheh et al., 2014). De modo

similar, a deleção do homólogo *veA* em *Aspergillus carbonarius* também causa uma redução drástica na produção de conídios (Crespo-Sempere et al., 2013). Dessa forma, TrAzf1 aparece como um novo regulador da conidiação em *T. reesei*, podendo atuar em conjunto com o fator de transcrição VEL1.

A busca do motivo de ligação para TrAzf1 na região promotora dos genes holocelulolíticos modulados por esse fator de transcrição nos levou ao motivo consenso descrito na Figura 26B. Esse motivo consenso corresponde às sequências individuais $A_2GA_2GACAGAG$ de *cel7a* e $A_2CACG_2AG_2AG$ de *swo*. Em *S. cerevisiae*, o motivo de ligação do dedo de zinco de Azf1 é bem caracterizado e corresponde à uma sequência de oito nucleotídeos: AAGAAAA (A_2GA_5) (Newcomb et al., 2002). Na levedura *Candida albicans*, a sequência GA_2GA_5 de Azf1 foi encontrada em promotores de genes envolvidos na manutenção da integridade da parede celular (Swidergall et al., 2015) e no fungo *M. oryzae*, o regulador COS1, homólogo de Azf1, se liga em seus promotores alvo através da sequência A_4GA_3 (Li et al., 2013). Apesar de se tratarem de fungos com características bastante distintas, o motivo de ligação de Azf1 parece ser bem conservado entre as espécies.

Nos experimentos de SPR para validar o motivo de ligação de Azf1 predito através de análise de bioinformática, nós encontramos valores de K_D relativamente altos quando comparados à literatura. Valores de K_D elevados sugerem uma baixa afinidade de ligação entre o ligante e seu alvo (Ritzefeld e Sewald, 2012). Nesse trabalho, nós utilizamos o sítio de ligação para fator de transcrição CBC de *A. fumigatus* (CCAAT) como controle negativo do experimento na última *flow cell*. A cinética da ligação desse regulador ao seu alvo no DNA, por exemplo, já foi descrita por Hortschansky e colaboradores, em 2015 (Hortschansky et al., 2015), e apresentou um valor de K_D 0.42 nM. Esse K_D é consideravelmente inferior ao que encontramos em nossos resultados (146,3 nM para *cel7a* e 170,5 nM para *swo*). Deve-se considerar que a interação não específica ocorrida na *flow cell* de referência pode influenciar nos valores de K_D obtidos. Essa inespecificidade pode ter ocorrido devido a uma possível interação entre o dedo de zinco de Azf1 e a matriz de dextrana do chip ou a superfície de estreptavidina. Para contornar esse problema, uma das medidas cabíveis é a alteração da composição do tampão de corrida aumentando, por exemplo, a concentração de sal (Ritzefeld e Sewald, 2012). Uma vez que os experimentos de SPR não foram conclusivos, as perspectivas para

avaliar a interação de Azf1 com o DNA incluem a otimização do experimento de SPR e a utilização de outras técnicas como os ensaios *in vivo* ChIP-Seq (do inglês, *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*) e *in vitro* EMSA (do inglês, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

A regulação da expressão gênica é o principal mecanismo pelo qual diferentes grupos de genes são modulados a fim de adequar a célula às condições ambientais que se encontra. Os fatores de transcrição desempenham funções importantes em todos os organismos e, em *T. reesei*, permitem que essa espécie se desenvolva em condições diversas utilizando as fontes de carbono disponíveis naquele momento como fonte de energia. Dessa forma, o novo regulador Azf1 descrito nesse trabalho, bem como seus homólogos em outras espécies holocelulolíticas, é um candidato em potencial para uma futura engenharia genética em *T. reesei*, visando a construção de novas linhagens mais eficientes quanto à produção de enzimas que degradam a biomassa vegetal.

Conclusão

VII) CONCLUSÃO

- O gene que codifica o fator de transcrição TrAzf1 de *T. reesei*, homólogo ao Azf1 de *S. cerevisiae*, é altamente expresso em fontes de carbono complexas como celulose e bagaço de cana, ao passo que em glicose, a expressão desse gene é praticamente indetectável.
- O mutante $\Delta azf1$ produz esporos menores e em quantidade reduzida em relação à linhagem parental, indicando que TrAzf1 pode estar envolvido nos mecanismos de esporulação em *T. reesei*.
- TrAzf1 atua como um regulador positivo da expressão de celulases. No total, 13 genes envolvidos com a degradação da parede celular vegetal, principalmente celulases, foram *down* regulados no mutante $\Delta azf1$ em celulose ou bagaço de cana.
- Além das celulases, os genes que codificam a *swollenin* e a hemicelulase Xyn4 também foram alvo da regulação por TrAzf1.
- O sítio de ligação para TrAzf1 foi predito nesse trabalho através de análise de bioinformática, considerando os 13 genes que se mostraram regulados por esse fator de transcrição. No entanto, a validação desse motivo por SPR não foi conclusiva e outros ensaios *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para validar o motivo de TrAzf1 em *T. reesei*.
- O papel de Azf1 na regulação da degradação da biomassa vegetal foi descrito, pela primeira vez, nesse trabalho. Esse fator de transcrição é um alvo em potencial para manipulação genética de *T. reesei*, visando o melhoramento da produção de enzimas holocelulolíticas por essa espécie.

Referências bibliográficas

VIII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, A., Ferraz, A. (2011). Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Química Nova* 34, 10.

Andberg, M., Penttilä, M., Saloheimo, M. (2015). Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresour Technol* 181, 105-113.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2016). In, pp. Dados estatísticos - Produção de etanol. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>. Acesso em dezembro de 2017.

Antoniêto, A. C. C., dos Santos Castro, L., Silva-Rocha, R., Persinoti, G. F., Silva, R. N. (2014). Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. *Fungal Genet Biol* 73, 93-103.

Antoniêto, A. C. C., Graciano de Paula, R., Santos Castro, L. d., Silva-Rocha, R., Felix Persinoti, G., Nascimento Silva, R. (2016). *Trichoderma reesei* CRE1-mediated Carbon Catabolite Repression in Response to Sophorose Through RNA Sequencing Analysis. *Curr Genomics* 17, 119-131.

Arantes, V., Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3, 4.

Aro, N. (2001). ACEII, a Novel Transcriptional Activator Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 24309-24314.

Aro, N., Ilmen, M., Saloheimo, A., Penttila, M. (2003). ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 56-65.

Aro, N., Saloheimo, A., Ilmen, M., Penttila, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 276, 24309-24314.

Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., Li, W. W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 34, W369-373.

Barros, T. D., Jardine, J. G. (2017) Etanol - Agência Embrapa de Informação tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em dezembro de 2017.

Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D., Marletta, M. A. (2011). Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society* 134, 890-892.

Benocci, T., Aguilar-Pontes, M. V., Zhou, M., Seiboth, B., de Vries, R. P. (2017). Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnology for Biofuels* 10.

- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L. (2014). Carboidratos. In Bioquímica, G. Koogan, ed.
- Bhattacharai, K., Stalick, W. M., McKay, S., Geme, G., Bhattacharai, N. (2011). Biofuel: An alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46, 1424-1442.
- Brady, S. K., Sreelatha, S., Feng, Y., Chundawat, S. P. S., Lang, M. J. (2015). Cellobiohydrolase 1 from *Trichoderma reesei* degrades cellulose in single cellobiose steps. *Nature Communications* 6, 10149.
- Brohl, S., Lisowsky, T., Riemen, G., Michaelis, G. (1994). A new nuclear suppressor system for a mitochondrial RNA polymerase mutant identifies an unusual zinc-finger protein and a polyglutamine domain protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 719-731.
- Castro, L. S., Antoniêto, A. C., Pedersoli, W. R., Silva-Rocha, R., Persinoti, G. F., Silva, R. N. (2014). Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. *Gene Expr Patterns* 14, 88-95.
- Craig, J. P., Coradetti, S. T., Starr, T. L., Glass, N. L. (2015). Direct Target Network of the *Neurospora crassa* Plant Cell Wall Deconstruction Regulators CLR-1, CLR-2, and XLR-1. *mBio* 6, e01452-01415.
- Cramer, Robert A., Mathioni, S. M., Patel, N., Riddick, B., Sweigard, J. A., Czymmek, K. J., Caplan, J. L., Kunjeti, S. G., Kunjeti, S., Raman, V., et al. (2013). Transcriptomics of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* in Response to the Bacterial Antagonist *Lysobacter enzymogenes* Reveals Candidate Fungal Defense Response Genes. *PLoS One* 8, e76487.
- Crespo-Sempere, A., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2013). VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int J Food Microbiol* 166, 479-486.
- Cruz, M. G. d., Guerreiro, E., Raiher, A. P. (2012). A Evolução da Produção de Etanol no Brasil, no Período de 1975 a 2009. *Revista Econômica do Nordeste* 43, 20.
- da Silva Delabona, P., Rodrigues, G. N., Zubieta, M. P., Ramoni, J., Codima, C. A., Lima, D. J., Farinas, C. S., da Cruz Pradella, J. G., Seiboth, B. (2017). The relation between *xyr1* overexpression in *Trichoderma harzianum* and sugarcane bagasse saccharification performance. *J Biotechnol* 246, 24-32.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int J Biol Sci*, 578-595.
- de Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H. M., Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *J Biotechnol* 236, 110-119.
- dos Santos Castro, L., de Paula, R. G., Antoniêto, A. C. C., Persinoti, G. F., Silva-Rocha, R., Silva, R. N. (2016). Understanding the Role of the Master Regulator XYR1 in *Trichoderma reesei* by Global Transcriptional Analysis. *Front Microbiol* 7.

dos Santos Castro, L., Pedersoli, W., Antoniêto, A. C., Steindorff, A., Silva-Rocha, R., Martinez-Rossi, N. M., Rossi, A., Brown, N., Goldman, G. H., Faça, V. M., et al. (2014). Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. *Biotechnology for Biofuels* 7, 41.

Druzhinina, I., Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science* 6B, 100-112.

Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microbial Biotechnology* 10, 15.

Elgogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E., Eldorrry, H. (1989). Mechanism by Which Cellulose Triggers Cellobiohydrolase-I Gene-Expression in *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6138-6141.

Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A., Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol* 36, 51-65.

Farinas, C. S. (2011). A Parede Celular Vegetal e As Enzimas Envolvidas na Sua Degradação. In Documentos, (Embrapa Instrumentação), p. 13.

Frei, M. (2013). Lignin: Characterization of a Multifaceted Crop Component. *The Scientific World Journal* 2013, 1-25.

Furukawa, T., Shida, Y., Kitagami, N., Mori, K., Kato, M., Kobayashi, T., Okada, H., Ogasawara, W., Morikawa, Y. (2009). Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol* 46, 564-574.

Galazka, J. M., Tian, C., Beeson, W. T., Martinez, B., Glass, N. L., Cate, J. H. (2010). Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 330, 84-86.

Genome Management Information System (2005). Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges. In Department of Energy Office of Science, G.M.I. System, ed. Disponível em: <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181&topic=53&citation=&general=&restsection=>. Acesso em dezembro de 2017.

Gianoulis, T. A., Griffin, M. A., Spakowicz, D. J., Dunican, B. F., Alpha, C. J., Sboner, A., Sismour, A. M., Kodira, C., Egholm, M., Church, G. M., et al. (2012). Genomic analysis of the hydrocarbon-producing, cellulolytic, endophytic fungus *Ascocoryne sarcoides*. *PLoS Genetics* 8, e1002558.

Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Luchessi, A. D., Bertolini, M. C. (2011). A Genome-wide Screen for *Neurospora crassa* Transcription Factors Regulating Glycogen Metabolism. *Molecular & Cellular Proteomics* 10, M111.007963.

Grant, C. E., Bailey, T. L., Noble, W. S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27, 1017-1018.

- Gritzali, M., Brown, R. D. (1983). Sophorose Stimulation of Cellulase Biosynthesis in the Fungus *Trichoderma reesei* QM9414. *Fed Proc* 42, 2084-2084.
- Gupta, V. K., Steindorff, A. S., de Paula, R. G., Silva-Rocha, R., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., Silva, R. N. (2016). The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? *Trends in Biotechnology* 34, 970-982.
- Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology* 29, 419-425.
- Hakkinen, M., Arvas, M., Oja, M., Aro, N., Penttila, M., Saloheimo, M., Pakula, T. M. (2012). Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microb Cell Fact* 11, 134.
- Hakkinen, M., Valkonen, M. J., Westerholm-Parvinen, A., Aro, N., Arvas, M., Vitikainen, M., Penttila, M., Saloheimo, M., Pakula, T. M. (2014). Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnol Biofuels* 7, 14.
- Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., Re, E., Navarro Poulsen, J.-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., et al. (2010). Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry* 49, 3305-3316.
- Hasper, A. A., Visser, J., de Graaff, L. H. (2000). 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* 36, 193-200.
- Head, I. M., Gray, N. D. (2016). Microbial Biotechnology 2020; microbiology of fossil fuel resources. *Microbial Biotechnology* 9, 626-634.
- Hon, D. N. S. (1994). Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose* 1, 1-25.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V. G. H. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* 5.
- Hortschansky, P., Ando, E., Tuppatsch, K., Arikawa, H., Kobayashi, T., Kato, M., Haas, H., Brakhage, A. A. (2015). Deciphering the Combinatorial DNA-binding Code of the CCAAT-binding Complex and the Iron-regulatory Basic Region Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factor HapX. *Journal of Biological Chemistry* 290, 6058-6070.
- Ilmen, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L., Penttila, M. E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1298-1306.
- Ipcho, S., Sundelin, T., Erbs, G., Kistler, H. C., Newman, M., Olsson, S. (2016). Fungal Innate Immunity Induced by Bacterial Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *Genes, Genomes, Genetics* 6, 11.

- Iuchi, S. (2001). Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 625-635.
- Jarvis, M. C. (2017). Structure of native cellulose microfibrils, the starting point for nanocellulose manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 376, 20170045.
- Karimi Aghchegh, R., Nemeth, Z., Atanasova, L., Fekete, E., Paholcsek, M., Sandor, E., Aquino, B., Druzhinina, I. S., Karaffa, L., Kubicek, C. P. (2014). The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS One* 9, e112799.
- Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L., Kubicekpranz, E. M. (1993a). The *Trichoderma* Cellulase Regulatory Puzzle - from the Interior Life of a Secretory Fungus. *Enzyme Microb Technol* 15, 90-99.
- Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mandels, M., Kubicekpranz, E. M. (1993b). Triggering of Cellulase Biosynthesis by Cellulose in *Trichoderma reesei* - Involvement of a Constitutive, Sophorose-Inducible, Glucose-Inhibited Beta-Diglycoside Permease. *Journal of Biological Chemistry* 268, 19364-19368.
- Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels* 2, 19.
- Kubicek, C. P., Muhlbauer, G., Klotz, M., John, E., Kubicekpranz, E. M. (1988). Properties of a Conidial-Bound Cellulase Enzyme-System from *Trichoderma reesei*. *J Gen Microbiol* 134, 1215-1222.
- Lange, J.-P. (2007). Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1, 39-48.
- Leu, S.-Y., Zhu, J. Y. (2012). Substrate-Related Factors Affecting Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses: Our Recent Understanding. *BioEnergy Research* 6, 405-415.
- Li, X., Han, X., Liu, Z., He, C. (2013). The function and properties of the transcriptional regulator COS1 in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Biol* 117, 239-249.
- Liu, T., Wang, T., Li, X., Liu, X. (2008). Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (cbh1) promoter optimization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 158-165.
- Lv, X., Zheng, F., Li, C., Zhang, W., Chen, G., Liu, W. (2015). Characterization of a copper responsive promoter and its mediated overexpression of the xylanase regulator 1 results in an induction-independent production of cellulases in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels* 8.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506-577.

- M.Abdel-Hamid, A., O.Solbiati, J., K.O.Cann, I. (2013). Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology* 82, 28.
- Machado, D. F. M., Parzianello, F. R., Silva, A. C. F. d., Antonioli, Z. I. (2012). *Trichoderma* Brazil: the fungus and the bioagent. *Revista de Ciências Agrárias* 35, 15.
- MacPherson, S., Larochele, M., Turcotte, B. (2006). A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 583-604.
- Mansfield, S. D., De Jong, E., Saddler, J. N. (1997). Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3804-3809.
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., et al. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* 26, 553-560.
- Mello-de-Sousa, T. M., Rassinger, A., Derntl, C., J. Poças-Fonseca, M., L Mach, R., R Mach-Aigner, A. (2016). The Relation Between Promoter Chromatin Status, Xyr1 and Cellulase Expression in *Trichoderma reesei*. *Curr Genomics* 17, 145-152.
- Menezes, C. R. d., Barreto, A. R. (2015). Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* 19, 27.
- Montoya, Q. V., Meirelles, L. A., Chaverri, P., Rodrigues, A. (2016). Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109, 633-651.
- Naidu, D. S., Hlangothi, S. P., John, M. J. (2018). Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydr Polym* 179, 28-41.
- Nakari-Setälä, T., Paloheimo, M., Kallio, J., Vehmaanpera, J., Penttilä, M., Saloheimo, M. (2009). Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4853-4860.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2014). Carboidratos e Glicoconjugados. In *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, Artmed, ed.
- Newcomb, L. L., Hall, D. D., Heideman, W. (2002). AZF1 is a glucose-dependent positive regulator of CLN3 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 22, 1607-1614.
- Nitta, M., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y., Ogasawara, W. (2012). A new Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor BglR regulates beta-glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology* 49, 388-397.

- Ogeda, T. L., Petri, D. F. S. (2010). Biomass Enzymatic Hydrolysis. *Química Nova* 33, 10.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Pacheco, T. F. (2011). Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? *Embrapa Agroenergia - Circular Técnica* 5, 6.
- Paulova, L., Patakova, P., Branska, B., Rychtera, M., Melzoch, K. (2015). Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol Adv* 33, 1091-1107.
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627-642.
- Pereira, N., Couto, M. A. P. G., Anna, L. M. M. S. (2008). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. . In *Series on Biotechnology*, (Rio de Janeiro), p. 47.
- Persikov, A. V., Singh, M. (2013). De novo prediction of DNA-binding specificities for Cys₂His₂ zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res* 42, 97-108.
- Peterson, R., Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement. *Microbiology* 158, 58-68.
- Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sandor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., et al. (2011a). The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics* 12, 269.
- Portnoy, T., Margeot, A., Seidl-Seiboth, V., Le Crom, S., Ben Chaabane, F., Linke, R., Seiboth, B., Kubicek, C. P. (2011b). Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. *Eukaryot Cell* 10, 262-271.
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J. C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jorgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., et al. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15079-15084.
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Biddy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., Davison, B. H., Dixon, R. A., Gilna, P., Keller, M., et al. (2014). Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science* 344, 1246843-1246843.
- Raízen. Etanol de primeira geração (2018). In. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-primeira-geracao>. Acesso em janeiro de 2018.
- Razin, S. V., Borunova, V. V., Maksimenko, O. G., Kantidze, O. L. (2012). Cys₂His₂ zinc finger protein family: Classification, functions, and major members. *Biochemistry (Moscow)* 77, 217-226.

Ritzefeld, M., Sewald, N. (2012). Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. *J Amino Acids* 2012, 1-19.

Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 279-291.

Saini, J. K., Saini, R., Tewari, L. (2014). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 5, 337-353.

Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylosmaki, E., Ward, M., Penttila, M. (2002a). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta-glucosidase BGLII (Cel1A). *Appl Environ Microbiol* 68, 4546-4553.

Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttilä, M. (2002b). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269, 4202-4211.

Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* 100, 923-935.

Sandgren, M., Stahlberg, J., Mitchinson, C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog Biophys Mol Biol* 89, 246-291.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* 37, 19-27.

Schiestl, R. H., Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-346.

Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., et al. (2016). The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 205-327.

Schuster, A., Bruno, K. S., Collett, J. R., Baker, S. E., Seiboth, B., Kubicek, C. P., Schmoll, M. (2012). A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels* 5, 1.

Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 787-799.

Seiboth, B., Ivanova, C., Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels.

Seiboth, B., Karimi, R. A., Phatale, P. A., Linke, R., Hartl, L., Sauer, D. G., Smith, K. M., Baker, S. E., Freitag, M., Kubicek, C. P. (2012). The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol* 84, 1150-1164.

- Shida, Y., Furukawa, T., Ogasawara, W. (2016). Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus. *Biosci Biotechnol Biochem* 80, 1712-1729.
- Sipos, B., Benkő, Z., Dienes, D., Réczey, K., Viikari, L., Siika-aho, M. (2009). Characterisation of Specific Activities and Hydrolytic Properties of Cell-Wall-Degrading Enzymes Produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on Different Carbon Sources. *Appl Biochem Biotechnol* 161, 347-364.
- Slattery, M. G., Liko, D., Heideman, W. (2006). The function and properties of the Azf1 transcriptional regulator change with growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 5, 313-320.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., et al. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206-2211.
- Sorieul, M., Dickson, A., Hill, S., Pearson, H. (2016). Plant Fibre: Molecular Structure and Biomechanical Properties, of a Complex Living Material, Influencing Its Deconstruction towards a Biobased Composite. *Materials* 9, 618.
- Stein, T., Kricke, J., Becher, D., Lisowsky, T. (1998). Azf1p is a nuclear-localized zinc-finger protein that is preferentially expressed under non-fermentative growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 34, 287-296.
- Sternberg, D., Mandels, G. R. (1979). Induction of Cellulolytic Enzymes in *Trichoderma reesei* by Sophorose. *J Bacteriol* 139, 761-769.
- Strakowska, J., Błaszczuk, L., Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J Basic Microbiol* 54, S2-S13.
- Strauss, J., Mach, R. L., Zeilinger, S., Hartler, G., Stöffler, G., Wolschek, M., Kubicek, C. P. (1995). Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett* 376, 103-107.
- Swidergall, M., van Wijlick, L., Ernst, J. F. (2015). Signaling domains of mucin Msb2 in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 14, 359-370.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Vanholme, R., Morreel, K., Darrah, C., Oyarce, P., Grabber, J. H., Ralph, J., Boerjan, W. (2012). Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol* 196, 978-1000.
- Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L., Kubicek, C. P. (2003). Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. *Mol Genet Genomics* 270, 46-55.
- Zeng, Y., Himmel, M. E., Ding, S.-Y. (2017). Visualizing chemical functionality in plant cell walls. *Biotechnology for Biofuels* 10.

Zhang, W. X., Kou, Y. B., Xu, J. T., Cao, Y. L., Zhao, G. L., Shao, J., Wang, H., Wang, Z. X., Bao, X. M., Chen, G. J., Liu, W. F. (2013). Two Major Facilitator Superfamily Sugar Transporters from *Trichoderma reesei* and Their Roles in Induction of Cellulase Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 288, 32861-32872.

Zhou, Z., Li, G., Lin, C., He, C. (2009). Conidiophore Stalk-less1 Encodes a Putative Zinc-Finger Protein Involved in the Early Stage of Conidiation and Mycelial Infection in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 402-410.

Zou, G., Shi, S., Jiang, Y., van den Brink, J., de Vries, R. P., Chen, L., Zhang, J., Ma, L., Wang, C., Zhou, Z. (2012). Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. *Microb Cell Fact* 11, 21.

Anexos

IX) ANEXOS

IX. 1) ANEXO 1: Produção durante o doutorado

Manuscrito em preparação:

A novel Cys₂His₂ zinc-finger homologue to AZF1 modulates cellulase expression in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. Autores: Amanda Cristina Campos Antoniêto, Karoline Maria Vieira Nogueira, Renato Graciano de Paula, Maria-Eugenia Guazzaroni, Luísa Czamanski Nora, Fausto Bruno dos Reis Almeida, Thiago Aparecido da Silva, Gustavo Henrique Goldman, Roberto Nascimento Silva e Rafael Silva-Rocha.

Artigos publicados durante o doutorado:

1. CAMPOS ANTONIÊTO, AMANDA CRISTINA; RAMOS PEDERSOLI, WELLINGTON; DOS SANTOS CASTRO, LÍLIAN; DA SILVA SANTOS, RODRIGO; CRUZ, ALINE HELENA DA SILVA; NOGUEIRA, KAROLINE MARIA VIEIRA; SILVA-ROCHA, RAFAEL; ROSSI, ANTONIO; SILVA, ROBERTO NASCIMENTO. Deletion of pH Regulator *pac-3* Affects Cellulase and Xylanase Activity during Sugarcane Bagasse Degradation by *Neurospora crassa*. PLoS One. Fator de Impacto (2016 JCR): 2,8060, v.12, p.e0169796 - , 2017.
2. DOS SANTOS CASTRO, LILIAN; DE PAULA, RENATO G.; ANTONIÊTO, AMANDA C. C.; PERSINOTI, GABRIELA F.; SILVA-ROCHA, RAFAEL; SILVA, ROBERTO N. Understanding the Role of the Master Regulator XYR1 in *Trichoderma reesei* by Global Transcriptional Analysis. Frontiers in Microbiology (Online). Fator de Impacto (2016 JCR): 4,0760, v.7, p.1 - 16, 2016.
3. ALMEIDA, FAUSTO; CRISTINA CAMPOS ANTONIÊTO, AMANDA; MOREIRA PESSONI, ANDRE; NEVES MONTEIRO, VALDIRENE; CLAUDIA PAIVA ALEGRE-MALLER, ANA; LACERDA PIGOSSO, LAURINE; PEREIRA, MARISTELA; MARIA DE ALMEIDA SOARES, CELIA; CRISTINA ROQUE-BARREIRA, MARIA. Influence

of N-glycans on Expression of Cell Wall Remodeling Related Genes in *Paracoccidioides Brasiliensis* Yeast Cells. *Current Genomics*. Fator de Impacto (2016 JCR): 1,8350, v.17, p.1 - 1, 2015.

4. CRISTINA CAMPOS ANTONIÊTO, AMANDA; GRACIANO DE PAULA, RENATO; DOS SANTOS CASTRO, LILIAN; SILVA-ROCHA, RAFAEL; FELIX PERSINOTI, GABRIELA; NASCIMENTO SILVA, ROBERTO. *Trichoderma reesei* CRE1-Mediated Carbon Catabolite Repression in Response to Sophorose Through RNA Sequencing Analysis. *Current Genomics*. Fator de Impacto (2016 JCR): 1,8350, v.17, p.1 - 1, 2015.

5. DOS SANTOS CASTRO, LILIAN; PEDERSOLI, WELLINGTON; ANTONIÊTO, AMANDA CRISTINA; STEINDORFF, ANDREI; SILVA-ROCHA, RAFAEL; MARTINEZ-ROSSI, NILCE M; ROSSI, ANTONIO; BROWN, NEIL; GOLDMAN, GUSTAVO H; FAÇA, VITOR M; PERSINOTI, GABRIELA F; SILVA, ROBERTO. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. *Biotechnology for Biofuels*. Fator de Impacto (2016 JCR): 5,2030, v.7, p.41 - , 2014.

6. SILVA-ROCHA, RAFAEL; CASTRO, LILIAN DOS SANTOS; ANTONIÊTO, AMANDA CRISTINA CAMPOS; GUAZZARONI, MARÍA-EUGENIA; PERSINOTI, GABRIELA FELIX; SILVA, ROBERTO NASCIMENTO. Deciphering the Cis-Regulatory Elements for XYR1 and CRE1 Regulators in *Trichoderma reesei*. *Plos One*. Fator de Impacto (2016 JCR): 2,8060, v.9, p.e99366 - , 2014.

7. ANTONIÊTO, AMANDA CRISTINA CAMPOS; CASTRO, LÍLIAN DOS SANTOS; SILVA-ROCHA, RAFAEL; PERSINOTI, GABRIELA FELIX; SILVA, ROBERTO NASCIMENTO. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. *Fungal Genetics and Biology* (Print). Fator de Impacto (2016 JCR): 3,0720, v.73, p.93 - 103, 2014.

8. CASTRO, LILIAN DOS SANTOS; ANTONIÊTO, AMANDA CRISTINA CAMPOS; PEDERSOLI, WELLINGTON RAMOS; ROCHA, RAFAEL SILVA; PERSINOTI, GABRIELA F.; SILVA, ROBERTO NASCIMENTO. Expression pattern of cellulolytic

and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. *Gene Expression Patterns* (Tokyo). Fator de Impacto (2016 JCR): 1,1580, v.14, p.88 - 95, 2014.

Artigo aceito para publicação:

1. Renato de Paula, Amanda Antoniêto, Cláudia Carraro, Gabriela Felix Persinoti, Nalu Teixeira Aguiar Peres, Nilce Martinez-Rossi, Rafael Silva-Rocha e Roberto N. Silva. "The Duality of MAPK Signaling Pathway in the Control of Metabolic Processes and Cellulases Production in *Trichoderma reesei*". *Scientific Reports*.

Capítulo de livro publicado:

1. DE PAULA, R.G.; CRISTINA CAMPOS ANTONIETO, AMANDA; SILVA, ROBERTO NASCIMENTO. The Panorama for Biofuels Biotechnology: Present and Future. In: Roberto do Nascimento Silva. (Org.). *Mycology: Current and Future Developments - Fungal Biotechnology for Biofuel Production*. 1ed. Beijing: Bentham e-books, 2016, v. 1, p. 3-22.

Apresentações de trabalho em congressos:

1. 13th European Conference on Fungal Genetics, Paris, França (2016). Trabalho apresentado: "The transcription factor Tr_a1 is involved in sporulation and cellulase production in *Trichoderma reesei*".

2. 19th European Carbohydrate Symposium – EUROCARB, Barcelona, Espanha (2017). Trabalho apresentado: "Holocellulases are under control of the transcription factor Azf1 in *Trichoderma reesei*".