



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Análise estrutural dos promotores dos genes de  
endoglicanase *egl1* e *egl4* de *Humicola grisea*  
var. *thermoidea***

**Natália Bittencourt de Oliveira Angarten**

Brasília, 2013



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Análise estrutural dos promotores dos genes de  
endoglicanase *egl1* e *egl4* de *Humicola grisea*  
var. *thermoidea***

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Biologia Celular do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília, como  
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre  
em Biologia Molecular.

**Natália Bittencourt de Oliveira Angarten**  
**Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca**

Brasília, 2013

Trabalho desenvolvido no Laboratório de  
Biologia Molecular, da Universidade de  
Brasília (UnB) sob orientação do Prof. Dr.  
Marcio José Poças Fonseca.

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Titulares:**

Dra. Janice Lisboa de Marco

Departamento de Farmácia (FAR/FS)

Universidade de Brasília - UnB

Dra. Nádia Skorupa Parachin

Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Universidade de Brasília - UnB

### **Orientador:**

Dr. Marcio José Poças Fonseca

Departamento de Genética e Morfologia (GEM/IB)

Universidade de Brasília - UnB

### **Suplente:**

Lídia Maria Pepe de Moraes

Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Universidade de Brasília - UnB

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família por mais essa conquista: meus pais, Luiz Fernando e Maria Lúcia, minhas irmãs, Marina e Marília, e meu irmãozinho Willian. Obrigada pelo apoio incondicional, paciência e ainda pelo suporte técnico e financeiro. Dedico esse trabalho inteiramente a vocês!

Agradeço também ao querido Robson pelo carinho, companheirismo, incentivo e pela grande ajuda ao longo dessa árdua caminhada. Muitíssimo obrigada!

Ao meu orientador, Marcio, pela orientação, ensinamentos, oportunidade e confiança para a concretização desse trabalho.

Às professoras Janice de Marco, Nádia Parachin e Lidia Pepe por aceitarem o convite para compor a banca examinadora dessa dissertação.

Um agradecimento especial ao Thiago pela grandiosa contribuição na realização desse projeto e pelos inúmeros ensinamentos. Às companheiras de bancada e de vida, Mariana e Tati. A todos os membros do laboratório 3 pela colaboração e amizade: professora Ildinete, Marciano, Calli, Lorena, Daniel, Fernanda, Fabiana, Paty, Nathália, Marco, Diogo e Bárbara. E aos que já não estão mais lá: Bárbara, Eveline, Thaís, Sâmia, Ricardo, Marília e menina Luana.

Aos professores e a todos os amigos da Biomol, em especial ao Túlio, à Érika, ao Rafael, ao José Carlos, à Galina e ao Hugo. Às professoras Janice e Larissa pelo grande apoio nos experimentos de biobalística. À dona Fátima, Ivonildes, Thompson e seu Antônio pela ajuda diária e essencial no laboratório.

Aos meus amigos que, direta ou indiretamente, tiveram grande participação nisso: Anninha, Samir, Izabela, Willian, Mary-Ann, Renata, Lygia e Stéphanie. E a todos os meus familiares pelo apoio e incentivo para a conquista de mais esta etapa.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

À Capes pelo apoio financeiro.

# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 A Conversão de Biomassa .....	1
1.2 Estrutura da Celulose .....	3
1.3 Celulases .....	5
1.4 <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> .....	6
1.5 Regulação da expressão de genes de enzimas do complexo celulolítico de fungos.....	8
1.6 PacC.....	9
1.7 CreA.....	13
1.8 Região promotora dos genes de celulase .....	15
1.9 Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA).....	16
1.10 Gene repórter .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral .....	20
3.2 Objetivos específicos .....	20
<b>4. MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
4.1 Microrganismos .....	21
4.1.1 <i>Hgvt</i> .....	21
4.1.2 <i>E.coli</i> .....	21
4.2 Soluções e meios para cultura de microrganismos.....	21
4.2.1 Soluções e meios de cultura para <i>E.coli</i> .....	21
4.2.2 Soluções e meios de cultura para <i>Humicola grisea</i> .....	22
4.3 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) .....	23
4.3.1 Tampão de corrida (5X), pH 8,3.....	23
4.3.2 Tampão de amostra (5X) .....	23
4.3.3 Solução corante .....	24
4.3.4 Solução descorante .....	24
4.3.5 Solução de poliacrilamida 30% (Acrilamida/Bisacrilamida 29:1).....	24
4.4 Soluções para o Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA).....	24
4.4.1 Solução de Poliacrilamida (vide 3.4.5).....	24
4.4.2 Solução de alta concentração de sal.....	24
4.4.3 Solução TEB (10X) .....	24
4.5 Soluções para a purificação de proteínas .....	24
<b>5. MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>

5.1	Reação em cadeia da Polimerase (PCR) .....	26
5.2	Transformação de células de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	26
5.3	Extração de DNA plasmidial em pequena escala.....	27
5.4	Extração de DNA plasmidial em média escala .....	27
5.5	Isolamento da região 5' UP dos genes de celulases .....	28
5.6	Clonagem no vetor gene repórter GOX .....	28
5.7	Análise da região 5'UP do gene <i>egl1</i> .....	30
5.8	Síntese de sondas para EMSA .....	30
5.9	Anelamento das sondas.....	32
5.10	Purificação das sondas .....	33
5.11	Produção dos domínios de ligação ao DNA das proteínas CreA e PacC .....	33
5.12	Equilíbrio da coluna de GST-Sepharose .....	34
5.13	Purificação de proteínas com o Kit Glutathione sepharose 4B .....	34
5.14	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	35
5.15	Quantificação de proteínas.....	36
5.16	Ensaio de EMSA.....	36
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
6.1	Amplificação das regiões 5' UP dos genes de celulase de <i>Hgvt</i> .....	37
6.2	Clonagem das regiões 5'UP no vetor repórter pGOX.....	38
6.3	Produção e purificação dos domínios de ligação ao DNA dos fatores de transcrição CreA e PacC.....	42
6.4	Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética .....	45
6.5	Região promotora de <i>egl1</i> .....	45
6.6	Região promotora de <i>egl4</i> .....	53
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>



## RESUMO

A limitação de recursos fósseis e o contínuo crescimento econômico tem aumentado a demanda por fontes alternativas para a produção de biocombustíveis e compostos químicos. A conversão da biomassa vegetal apresenta grande potencial para esse fim, já que representa a maior fonte renovável do planeta. O fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* (*Hgvt*) é conhecido por produzir uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas termoestáveis. Dentre as hidrolases produzidas por esse organismo estão as celulases, xilanases, glicoamilases e trealases. Tais enzimas possuem grande potencial biotecnológico para a conversão de resíduos agroindustriais em produtos de maior valor agregado tais como ração animal, adubo, biocombustíveis, além de extração de óleos vegetais, processamento têxtil, branqueamento e reciclagem de papéis. A caracterização e a compreensão dos mecanismos regulatórios dos genes que codificam enzimas hidrolíticas são de grande importância para o aprimoramento de estratégias de produção dessas enzimas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a análise estrutural das regiões 5' não codificadoras a montante dos genes de endoglicanase 1 (*egl1*), endoglicanase 4 (*egl4*) e celobiohidrolase 1.1 (*cbh1.1*) de *Hgvt*. As regiões 5'UP foram amplificadas a partir de DNA genômico de *Hgvt* e clonadas no vetor pGOX, contendo marca de resistência à higromicina B e o cassete de expressão do gene de glicose oxidase (*goxA*) de *Aspergillus niger* como repórter visando a posterior caracterização funcional em sistema heterólogo de *Aspergillus nidulans*.

As regiões promotoras de *egl1* e *egl4* foram inicialmente analisadas *in silico* quanto à presença de sítios de ligação para os fatores transcricionais PacC, regulador da expressão gênica em resposta ao pH, e CreA, mediador da repressão transcricional por glicose. A fim de se avaliar a interação desses fatores com os promotores foram sintetizadas sondas contendo sítios de ligação para CreA e para PacC. Os domínios de ligação de PacC e CreA foram produzidos em *Escherichia coli* como proteínas de fusão à glutationa-S-transferase (GST). As proteínas recombinantes e as sondas foram empregadas em ensaios de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA).

Foi observada a formação de complexos específicos entre DNA e proteína em dois sítios para PacC e em dois sítios para CreA presentes na região promotora de *egl1*, o que aponta para a participação desses fatores na regulação do gene. Com relação ao gene *egl4*, não foi observada a interação entre o fator transcricional PacC e a região

promotora do gene. Entretanto, houve formação de complexos entre CreA e os sítios presentes na região 5'UP de *egl4*. Apesar de reconhecerem os sítios consenso na região desse gene, nenhuma das interações mostrou ser específica. Tais dados sugerem que a regulação da expressão de *egl4* obedeça a mecanismos distintos aos dos demais genes de celulase de *Hgvt* estudados até o momento.

**Palavras-chave:** *Humicola grisea* var. *thermoidea*; EMSA; promotores de genes de celulase.

## ABSTRACT

Fossil fuels limited supply and the continuous economic growth have shifted the demand for renewable sources for the production of biofuels and other biomaterials. Plant biomass conversion depicts an interesting potential to this goal, since it represents the most abundant and renewable energy source on the planet. The thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* (*Hgvt*) is well known for its capability to generate thermostable hydrolytic enzymes, such as cellulases, xylanases, glucoamylases and trehalases. These enzymes have great biotechnological potential to convert bio-based feedstocks into products with a higher added value, for instance: animal feed, fertilizers, biofuels and also for the extraction of vegetable oils, textiles processing (biopolishing and biostoning) and paper recycling. Comprehension and characterization of the regulatory mechanisms of hydrolytic enzyme-encoding genes are of great importance to the optimization of these enzymes production. Therefore, the present work aimed the analysis of the 5' upstream regions of the *Hgvt* endoglucanase 1 (*egl1*), endoglucanase 4 (*egl4*) and cellobiohydrolase 1.1 (*cbh 1.1*) genes. These regions were obtained from *Hgvt* genomic DNA and cloned into the pGOX vector. This cloning vector contains a hygromycin selection marker and an *Aspergillus niger* glucose oxidase (*goxA*) expression cassette for posterior functional characterization in the *Aspergillus nidulans* heterologous system expression.

*egl1* and *egl4* genes promoters were analyzed *in silico* for the presence of binding sites for the pH-responsive transcriptional factor PacC and for the catabolite repressor transcriptional factor CreA. In order to assess the interaction of these factors with the gene promoters, DNA probes containing CreA or PacC binding sites were utilized. PacC and CreA DNA binding domains were produced in *Escherichia coli* as a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein. The recombinant proteins and DNA probes interaction was investigated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

DNA/protein specific interactions were observed between two PacC and two CreA binding sites situated on *egl1* promoter region indicating that this gene expression is regulated by pH and by carbon source. Regarding the *egl4* promoter, no interaction was detected with PacC. On the other hand, CreA/DNA complexes were detected for the *egl4* 5' upstream region but none of these interactions showed to be specific thus suggesting that this gene is subject to an alternative regulatory mechanism.

**Keywords:** *Humicola grisea* var. *thermoidea*; EMSA; cellulose gene promoters.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da celulose .....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura da parede celular vegetal .....	4
<b>Figura 3.</b> Enzimas do complexo celulolítico de fungos .....	6
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de regulação em resposta a pH em <i>A. nidulans</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética.....	16
<b>Figura 6.</b> Mecanismo catalítico da enzima glicose oxidase .....	18
<b>Figura 7.</b> Mapa do vetor pGOX.....	29
<b>Figura 8.</b> Análise eletroforética em gel de agarose da amplificação por PCR das regiões 5'UP dos genes <i>egl1</i> , <i>egl4</i> e <i>cbh1.1</i> de <i>Hgvt</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do vetor pGOX contendo o promotor do gene <i>egl1</i> ( <i>peg11</i> ) na orientação correta (A) e análise eletroforética em gel de agarose da digestão de pGOX:: <i>egl1</i> com a enzima <i>EcoR</i> I (B).....	39
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do vetor pGOX contendo o promotor do gene <i>egl4</i> ( <i>peg4</i> ) na orientação correta (A) e análise eletroforética em gel de agarose da digestão de pGOX:: <i>egl4</i> com a enzima <i>BamH</i> I (B). .....	40
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do vetor pGOX contendo o promotor do gene <i>cbh1.1</i> ( <i>pcb1.1</i> ) na orientação correta (A) e análise eletroforética em gel de agarose da digestão de pGOX:: <i>egl1</i> com as enzimas <i>Xba</i> I e <i>Xho</i> I (B). .....	41
<b>Figura 12.</b> Perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas recombinantes CreA-GST (A) e PacC-GST (B). .....	44
<b>Figura 13.</b> Região promotora de <i>egl1</i> de <i>Hgvt</i> . .....	45
<b>Figura 14.</b> EMSA da interação entre as sondas de <i>egl1</i> e os domínios de ligação ao DNA das proteínas PacC e CreA.....	46
<b>Figura 15.</b> Ensaios de competição utilizando competidores específicos para as sondas de <i>egl1</i> .....	47
<b>Figura 16.</b> Ensaios de competição utilizando versões mutadas das sondas de <i>egl1</i> .....	48
<b>Figura 17.</b> Ensaio utilizando competidores com mutação em apenas um dos dois sítios para PacC nas sondas de <i>egl1</i> .....	49
<b>Figura 18.</b> EMSA utilizando competidores com mutação em apenas um dos dois sítios para PacC em concentrações molares menores para as sondas de <i>egl1</i> . .....	50
<b>Figura 19.</b> Ensaio utilizando competidores com mutação em apenas um dos dois sítios para CreA para as sondas de <i>egl1</i> .....	52
<b>Figura 20.</b> Região promotora de <i>egl4</i> de <i>Hgvt</i> . .....	53
<b>Figura 21.</b> EMSA da interação entre as sondas de <i>egl4</i> e os domínios de ligação ao DNA das proteínas PacC e CreA.....	54
<b>Figura 22.</b> Ensaio de competição utilizando competidores específicos para as sondas de <i>egl4</i> . .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para PCR .....	26
<b>Tabela 2.</b> Sondas correspondentes à região promotora de <i>egl1</i> utilizadas no ensaio de retardo de mobilidade eletroforética.....	31
<b>Tabela 3.</b> Sondas correspondentes à região promotora de <i>egl4</i> utilizadas no ensaio de retardo de mobilidade eletroforética.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

1X	Concentração para uso
5X	Cinco vezes concentrado
25X	Vinte e cinco vezes concentrado
50X	Cinquenta vezes concentrado
150X	Cento e cinquenta vezes concentrado
5' UP	Região 5' não codificadora a montante do gene
APS	Persulfato de amônio
CreA/CRE1	Fator transcricional que media a repressão transcricional em presença de glicose
CreAHg-GST	Domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de <i>H. grisea</i> fusionado à GST
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	Sulfato cúprico pentahidratado
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (e outros)
FAM	Fluoróforo 6-carboxi-fluoresceína
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	Sulfato de ferroso heptahidratado
<i>g</i>	Unidade de medida da força centrífuga
GST	Glutathione S-transferase
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
<i>Hgvt</i>	<i>Humicola grisea</i> variedade <i>thermoidea</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo.
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Quilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliampère

Mb	Megabase
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -10H <sub>2</sub> O	Tetraborato de sódio (Bórax) decahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	Molibdato de Sódio Dihidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica a 600 nm.
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomoles
PMSF	Flúoreto fenil metil sulfonil
poli(dI-dC)	Polímero sintético de deoxiinosina e deoxicitidina (utilizado como competidor inespecífico em EMSA)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEB	Tampão Tris-EDTA-borato
TEMED	N,N,N',N' – tetrametil etilenodimetilamida
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
ZnCl <sub>2</sub>	Cloreto de zinco
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinco heptahidratado



# INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Conversão de Biomassa

O contínuo crescimento econômico e populacional tem aumentado a demanda energética em todo o mundo. Estima-se que esta será 50% maior em 2050 de forma que a utilização de fontes finitas de petróleo não será satisfatória a longo prazo (Ragauskas *et al.*, 2006). A ameaça de esgotamento das reservas petrolíferas, bem como o alto custo do seu produto, tem levado a grande insegurança no que se refere a fontes energéticas futuras.

Sob o ponto de vista ambiental, a utilização generalizada de combustíveis fósseis tem levado ao aumento de emissões atmosféricas de compostos químicos poluentes e de gases de efeito estufa, especialmente de dióxido de carbono (revisto por Westbrook, 2013). A mudança na dependência da sociedade pelo petróleo é um importante passo para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável (Ragauskas *et al.*, 2006) e para a garantia de segurança energética às gerações futuras. Dessa forma, aumentou-se o interesse em fontes alternativas de energia de duração ilimitada e de menor impacto ambiental do que a tradicional (revisto por Westbrook, 2013).

A conversão de biomassa vegetal apresenta grande potencial para o desenvolvimento de biocombustíveis e de outros produtos, uma vez que, esta representa a maior fonte de energia renovável do planeta. O componente mais abundante da biomassa vegetal é a celulose, encontrada quase que exclusivamente na parede celular de plantas (revisto por Lynd *et al.*, 2002). Estima-se que a produção mundial desse polímero seja de  $4 \times 10^9$  toneladas por ano (revisto por Aro *et al.*, 2005). A parede celular vegetal é constituída ainda por outros elementos tais como a hemicelulose e a pectina que juntamente com proteínas e a lignina formam uma estrutura complexa e rígida (Pauly & Keegstra, 2008). A lignina e os açúcares derivados da biomassa vegetal podem ser convertidos em combustíveis, produtos químicos, materiais biológicos de valor agregado e os resíduos desse processo utilizados para a geração de energia (revisto por Pu *et al.*, 2011).

A conversão da biomassa lignocelulósica requer sistemas enzimáticos para degradação dos polissacarídeos constituintes em compostos monoméricos (revisto por Zou *et al.*, 2012). Muitos microrganismos produzem enzimas capazes de realizar esse processo. Fungos filamentosos, por exemplo, produzem celulases, hemicelulases, pectinases e lignases que degradam a parede celular de plantas fornecendo nutrientes para o organismo, ao mesmo tempo em que promovem a reciclagem de carbono no ambiente (Aro *et al.*, 2005), um processo de vital importância para o funcionamento do ecossistema global.

As celulases de fungos e também de bactérias são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, de reciclagem de papel, de detergentes, de têxteis e há interesse crescente no seu potencial de conversão da biomassa celulósica em açúcares fermentáveis (revisto por Sandgren *et al.*, 2003) e na utilização destes para a produção de biocombustíveis.

A geração de bioetanol a partir de açúcares derivados de resíduos agrícolas pode substituir em parte o uso de combustíveis fósseis, além de agregar valor a produtos provenientes de atividades agroindustriais. No Brasil, a produção de bioetanol a partir da sacarose da cana-de-açúcar é de, aproximadamente, 6.000 litros de álcool por hectare. A sacarificação dos resíduos gerados por esse tipo cultura poderia aumentar a quantidade em cerca de 3.700-4.000 litros. Esse reaproveitamento reduz a área necessária para o plantio, (Souza *et al.*, 2011) bem como o acúmulo de resíduos lignocelulósicos provenientes do cultivo da cana.

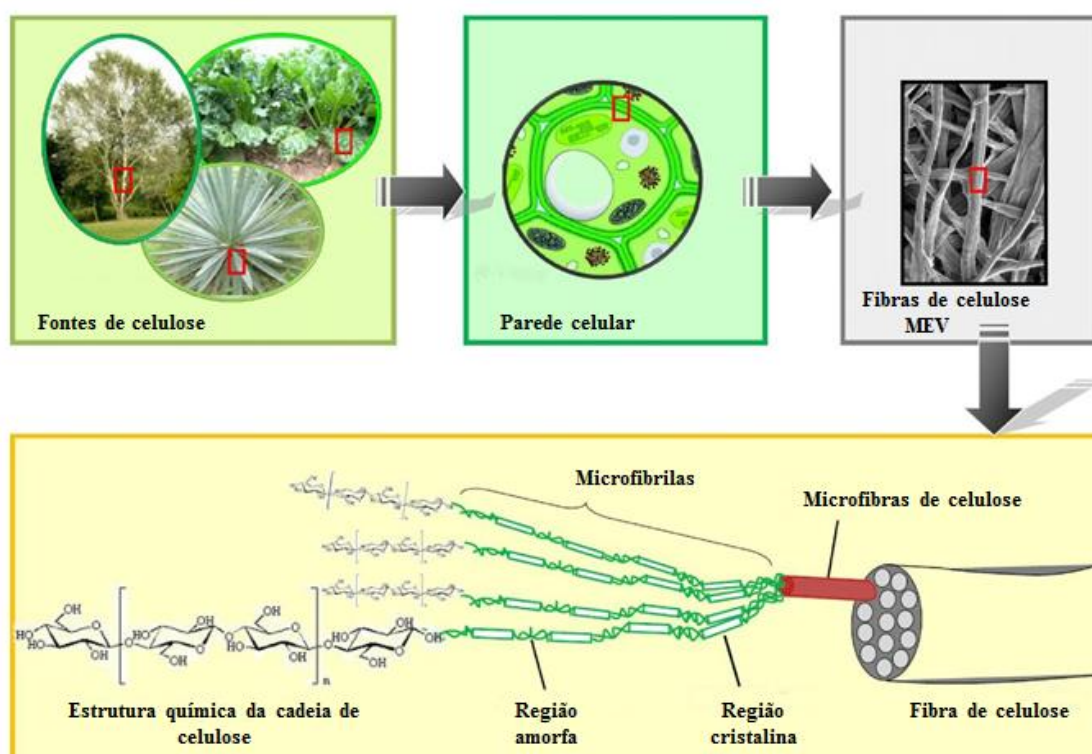
Entretanto, a bioconversão de celulose é ainda dificultada pela existência de obstáculos econômicos e técnicos. A degradação enzimática é a etapa mais onerosa e limitante desse processo (revisto por Penttilä *et al.*, 2013). Por esse motivo, muitos esforços estão sendo realizados a fim de aprimorar a produção de celulases para uso em escala industrial, bem como na obtenção de enzimas com maior eficiência catalítica, estabilidade, atividade em diferentes temperaturas e valores de pH e maior tolerância à inibição pelo produto final da reação.

A hidrólise é ainda dificultada pela estrutura fibrosa e cristalina da celulose e pela camada de lignina e hemicelulose. A produção eficiente de açúcares fermentáveis requer a desconstrução da parede celular (revisto por Pingali *et al.*, 2010). Muitos estudos visam à diminuição da recalcitrância da lignocelulose utilizando pré-

tratamentos químicos e físicos de modo a remover a lignina e hemicelulose reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade do material, (revisto por Sun & Cheng, 2002) permitindo assim, maior acesso das enzimas aos substratos.

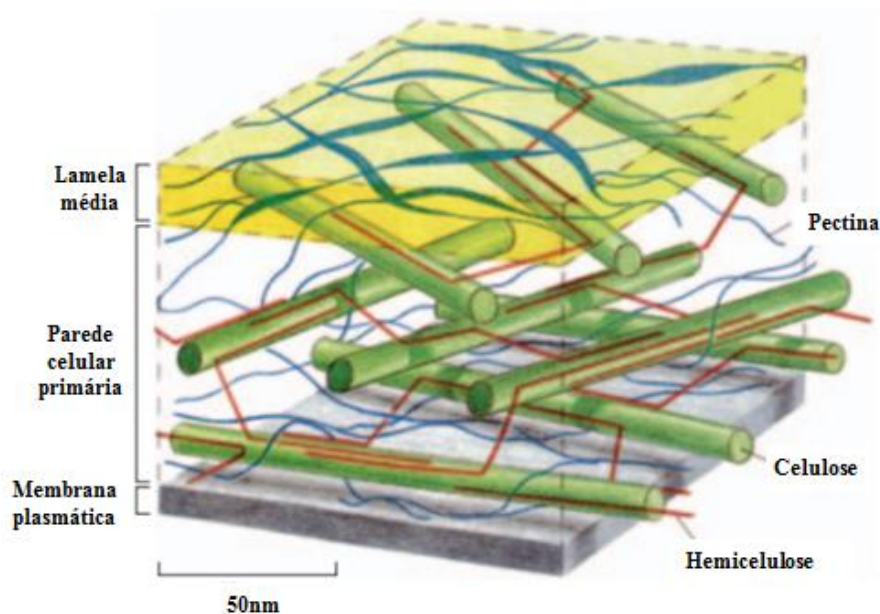
## 1.2 Estrutura da Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo composto por unidades de  $\beta$ -D-glicopirranose unidas por ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Aproximadamente 30 moléculas individuais são agregadas em unidades maiores. Essas são organizadas em microfibras que se associam formando as fibras de celulose (revisto por Lavoine *et al.*, 2012). A estrutura do polímero é formada por regiões cristalinas nas quais as cadeias de celulose são unidas por ligações de hidrogênio formando uma estrutura insolúvel (revisto por Aro *et al.*, 2005) entremeadada por regiões amorfas de menor compactação (**Fig. 1**).



**Figura 1.** Estrutura da celulose. A celulose está presente na parede celular vegetal e é composta por unidades de  $\beta$ -D-glicopirranose. Estas moléculas são agregadas em microfibrilas que se associam formando as microfibras de celulose. A fibra de celulose, por sua vez, é constituída pela associação destas microfibras. MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura (adaptado de Lavoine *et al.*, 2012).

A celulose é ainda circundada por uma rede de outros polímeros, incluindo hemiceluloses, pectinas e lignina (**Fig. 2**). A presença de hemicelulose e lignina dificulta ainda mais o acesso das celulases às fibras de celulose diminuindo a eficiência de sua degradação (revisto por Sun & Cheng, 2002).



**Figura 2.** Estrutura da parede celular vegetal primária e seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e pectina (Adaptado de Scheller & Ulvskov, 2010).

A hemicelulose representa entre 25 e 35% da biomassa e é um polímero heterogêneo composto por pentoses D-xilose, D-arabinose, D-manose, D-glicose e D-galactose (revisto por Kumar *et al.*, 2008).

A lignina consiste de uma matriz altamente ramificada de resíduos aromáticos e preenche o espaço entre a celulose, hemicelulose e pectina na parede da célula vegetal (revisto por Medie *et al.*, 2012). Trata-se de um composto essencial para a manutenção da integridade da parede celular e proteção contra a ação de patógenos (revisto por Pestana-Calsa *et al.*, 2012). A lignina é um dos resíduos gerados durante a produção de bioetanol e sua conversão em produtos de maior valor agregado é ainda um desafio (revisto por Kumar *et al.*, 2008).

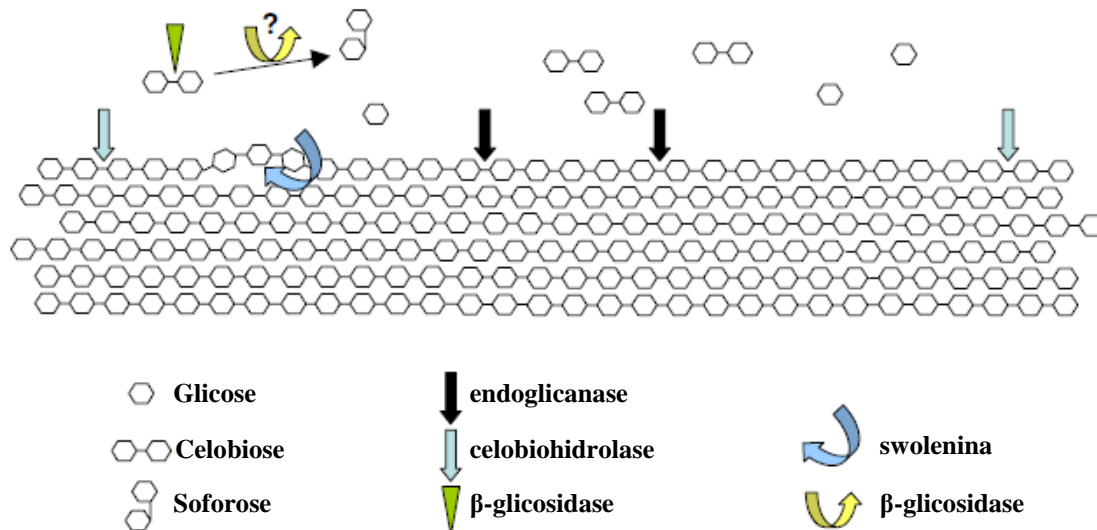
A pectina é o terceiro maior grupo de polissacarídeos de parede celular vegetal. Sua estrutura é formada por cadeias laterais de ramnose, arabinose, galactose e xilose. A

pectina apresenta diversas utilidades na indústria têxtil e de alimentos como emulsificantes, texturizador e espessante e pode ser convertida a açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis (revisto por Kumar *et al.*, 2008).

### 1.3 Celulases

Celulases são enzimas pertencentes à superfamília das glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-) que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e outras classes de moléculas (Cantarel *et al.*, 2009). Enzimas dessa superfamília são fundamentais no metabolismo de carboidratos, sendo produzidas por archaeas, bactérias e eucariotos (Henrissat, 1991). As celulases compõem pelo menos 12 das mais de 130 famílias que constituem essa superfamília (revisto por Sandgren *et al.*, 2003).

As celulases catalisam a reação de hidrólise sobre ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, que estão entre as mais estáveis e predominantes na natureza (Bu *et al.*, 2012). A degradação completa da celulose requer a atuação conjunta de enzimas que são classificadas em três grupos de acordo com a atividade sobre o substrato (**Fig. 3**): as endoglicanases (EC 3.2.1.4), as exoglicanases (celobiohidrolases) (EC 3.2.1.91) e as  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglicanases catalisam a clivagem randômica das ligações internas da cadeia de celulose gerando oligossacarídeos e novas extremidades livres. As celobiohidrolases atacam as extremidades redutoras e não redutoras da cadeia liberando moléculas de glicose e de celobiose (revisto por Lynd *et al.*, 2002). As  $\beta$ -glicosidases são ativas em celo-oligossacarídeos e celobiose, liberando monômeros de glicose a partir dessas moléculas (revisto por Kumar *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Enzimas do complexo celulolítico. A hidrólise da celulose requer a atuação conjunta de celulasas. As endoglicanases catalisam a clivagem de ligações internas da cadeia, as celobiohidrolases atuam nas regiões redutoras e não-redutoras do polissacarídeo e as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam celooligossacarídeos e celobiose. Acredita-se que a beta-glicosidase atue ainda na transglicosilação de celobiose em sofrorose. A swolenina é uma proteína que realiza a quebra mecânica de ligações entre as cadeias de celulose permitindo um maior acesso das enzimas ao substrato (Adaptado de Aro *et al.*, 2005).

As celobiohidrolases e endoglicanases apresentam uma estrutura característica que consiste em um domínio de ligação ao carboidrato, um domínio catalítico responsável pela hidrólise do substrato e uma região dobradiça, rica em resíduos de serina, treonina e prolina, que conecta esses domínios (revisto por Li *et al.*, 2011). Entretanto, o domínio de ligação e a região dobradiça podem estar ausentes em algumas delas (Poças-Fonseca *et al.*, 1997; Takashima *et al.*, 1999).

As celulasas são comercializadas há mais de 30 anos (Kuhad *et al.*, 2011) e atualmente representam a terceira maior indústria de enzimas no mundo. Wilson (2009) acredita que, caso venham a ser empregadas na produção de biocombustíveis, as celulasas passem a ocupar a primeira posição.

#### 1.4 *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Os fungos estão entre os maiores organismos celulolíticos. Diversas espécies já foram descritas como produtoras de enzimas que degradam a celulose, tais como

espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Schizophyllum* e *Aspergillus*, sendo o primeiro mais extensivamente estudado.

O gênero *Humicola* inclui diversas espécies de fungos termofílicos encontrados no solo e capazes de degradar substratos naturais complexos. Esses organismos são frequentemente citados como fonte de enzimas termoestáveis (Li *et al.*, 2011).

O fungo termofílico *Humicola grisea* apresenta uma ampla distribuição geográfica (White & Downing, 1953) sendo que a linhagem utilizada em nosso laboratório, *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Hgv<sub>t</sub>), foi isolada em solo brasileiro (Araújo *et al.*, 1983). Esse organismo apresenta um crescimento ótimo entre as temperaturas de 40°C (Araújo *et al.*, 1983) e 42°C (Azevedo *et al.*, 1990).

O fungo Hgv<sub>t</sub> é conhecido por produzir uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas termoestáveis. Dentre as hidrolases produzidas por esse organismo estão as celulases (Azevedo *et al.*, 1990, Ferreira-Filho, 1996; Poças-Fonseca *et al.*, 1997; De-Paula *et al.*, 1999; Pocas-Fonseca *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2010; Benoliel *et al.*, 2010), xilanases (Da-Silva *et al.*, 1994; Mandalari *et al.*, 2008), glicoamilases (Campos & Felix, 1995) e trealases (Zimmermann *et al.*, 1990).

Diversos genes de celulase e xilanase tais como *bgl4* (Takashima *et al.*, 1996; 1999), *egl1* (Takashima *et al.*, 1996), *egl2* (Takashima *et al.*, 1997), *egl3* (Takashima *et al.*, 1999), *egl4* (Takashima *et al.*, 1999), *cbh1.1* (Azevedo *et al.*, 1990; Takashima *et al.*, 1996), *cbh1.2* (Poças-Fonseca *et al.*, 1997), *xyn1* (Iikura *et al.*, 1997) e *xyn2* (De-Faria *et al.*, 2002) foram clonados e caracterizados.

Diante da produção enzimática desse organismo, o fungo Hgv<sub>t</sub> apresenta grande potencial biotecnológico visto que suas enzimas podem ser utilizadas em processos industriais na degradação de substratos lignocelulósicos. Apesar do seu potencial biotecnológico, pouco se sabe acerca da regulação de expressão de seus genes (Mello-de-Souza *et al.*, 2011).



## 1.5 Regulação da expressão de genes de enzimas do complexo celulolítico de fungos

A produção de enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal em fungos filamentosos é regulada principalmente no nível transcricional (Aro *et al.*, 2005) sendo a regulação de genes de celulases e xilanases mais bem descrita para os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*.

A presença de fontes de carbono mais facilmente metabolizáveis e energeticamente mais favoráveis, tais como glicose, resulta na repressão de vários genes necessários para a degradação de fontes alternativas de carbono (revisto por Aro *et al.*, 2005). A indução de genes de celulase é mediada pelo produto da hidrólise da celulose uma vez que esse polímero é muito grande para adentrar a célula e ser reconhecido como indutor. A produção de pequenas quantidades de enzimas seriam as responsáveis pela produção de indutores menores, tal como um oligossacarídeo, que então ativaria a transcrição de genes de celulase (Mandels & Reese, 1960).

No que se refere ao complexo celulolítico de *Hgvt*, Poças-Fonseca e colaboradores (2000) demonstraram o padrão diferencial de expressão de duas celobiohidrolases em relação à fonte de carbono disponível. Enquanto que a expressão de *cbh1.1* foi ausente em fontes mais facilmente utilizáveis como glicose, glicerol ou xilose, *cbh1.2* foi constitutivamente expresso independentemente da fonte de carbono ou sua concentração, até mesmo glicose não apresentou efeitos inibitórios (Poças-Fonseca *et al.*, 2000). Em 2011, Mello-de-Sousa e colaboradores verificaram por meio de PCR em tempo real que há um aumento notável e paralelo nos níveis de mRNA de seis genes de celulase e um de xilanase (*cbh1.1*, *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *bgl4* e *xyn1*) quando *Hgvt* foi crescido em fonte complexa de carbono constituída por bagaço de cana-de-açúcar. O mesmo resultado não foi observado, entretanto, para o gene *egl4*, para o qual não houve diferença de acúmulo de transcritos quando utilizados bagaço de cana-de-açúcar ou glicose como única fonte de carbono. Além disso, nesse trabalho foi ainda observado que glicose como única fonte de carbono não reprimiu por completo a transcrição dos genes de celulase e xilanase analisados.

Estudos recentes apontam para outros fatores envolvidos na regulação de genes de celulases e hemicelulases. Zhang e colaboradores (2012) analisaram o efeito de uma GTPase na regulação da expressão de *cbh1* e *cbh2* em *T. reesei*. Foi observado que essa

proteína, por uma via ainda desconhecida, age na modulação da expressão de genes de fatores transcricionais tais como *xyr1*, *ace1* e *cre1* que regulam a expressão de genes de celulase nesse organismo. Ainda em *T. reesei*, Seiboth e colaboradores (2012), demonstraram o envolvimento da metilação do DNA na regulação de genes do complexo lignocelulolítico. Foi observado que a deleção do gene de metiltransferase LAE1 acarretou na repressão de genes de celulase, xilanases e fatores envolvidos na degradação de celulose. Em contrapartida, a maior expressão de *lae-1* provocou o aumento na transcrição de genes de celulasas uma vez que a expressão do ativador transcricional, Xyr1, mostrou ser dependente de LAE1.

Coradetti e colaboradores (2012) sugerem o desenvolvimento de mecanismos independentes de expressão de genes de celulase e hemicelulase em resposta a diferentes indutores. Esses pesquisadores identificaram dois fatores transcricionais em *Neurospora crassa*, CLR-1 e CLR-2, conservados em diversos fungos filamentosos e que estão envolvidos na regulação de genes responsáveis pela degradação de celulose, mas não de hemicelulose. Já o fator XlnR/Xyr1, que em *A. nidulans* e *T. reesei* estão envolvidos na regulação de genes de celulase e hemicelulase, em *N. crassa* está relacionado a regulação de genes de hemicelulase e não são requeridos para a transcrição de genes de celulase.

A compreensão de diferentes mecanismos de regulação bem como o estudo de fatores transcricionais envolvidos nesse processo servirão como base para o desenvolvimento de linhagens capazes de produzir enzimas para aplicação industrial ou de produzir promotores artificiais para produção de proteínas heterólogas (Mach & Zeilinger, 2003).

## **1.6 PacC**

Em seu ambiente natural, os microrganismos estão expostos às mais diversas condições e dentre elas está a ampla variação de pH do meio. Para sobreviver e se reproduzir, são necessários mecanismos que permitam a adaptação a essas flutuações. Mudanças no pH do ambiente causam estresse nas funções celulares, incluindo alterações na disponibilidade de micronutrientes, função de proteínas e potencial de membrana (Selvig & Alspaugh, 2011). Muitos organismos secretam enzimas

extracelulares e outros metabólitos que modificam seus ambientes (Espeso *et al.*, 1997). Essas moléculas, por sua vez, devem ser funcionais nas condições às quais estão sendo expostas. *Aspergillus nidulans*, por exemplo, que é capaz de sobreviver tanto em condições acídicas quanto básicas (pH entre 3,5 e 9,0), sintetizam fosfatases ácidas predominantemente em meio ácido e fosfatases alcalinas em valores mais altos de pH (Caddick *et al.*, 1986).

A capacidade dos fungos de crescer em uma ampla variedade de pH é devido, em parte, ao sistema de regulação gênica que adapta a expressão de genes ao pH do ambiente (Arst & Penalva, 2003). O fator transcricional PacC, descrito primeiramente em *A. nidulans*, está envolvido na regulação gênica em resposta ao pH. Essa proteína atua na ativação de genes que devam ser expressos em condições alcalinas e previne a transcrição daqueles expressos em ambientes ácidos (Tilburn *et al.*, 1995).

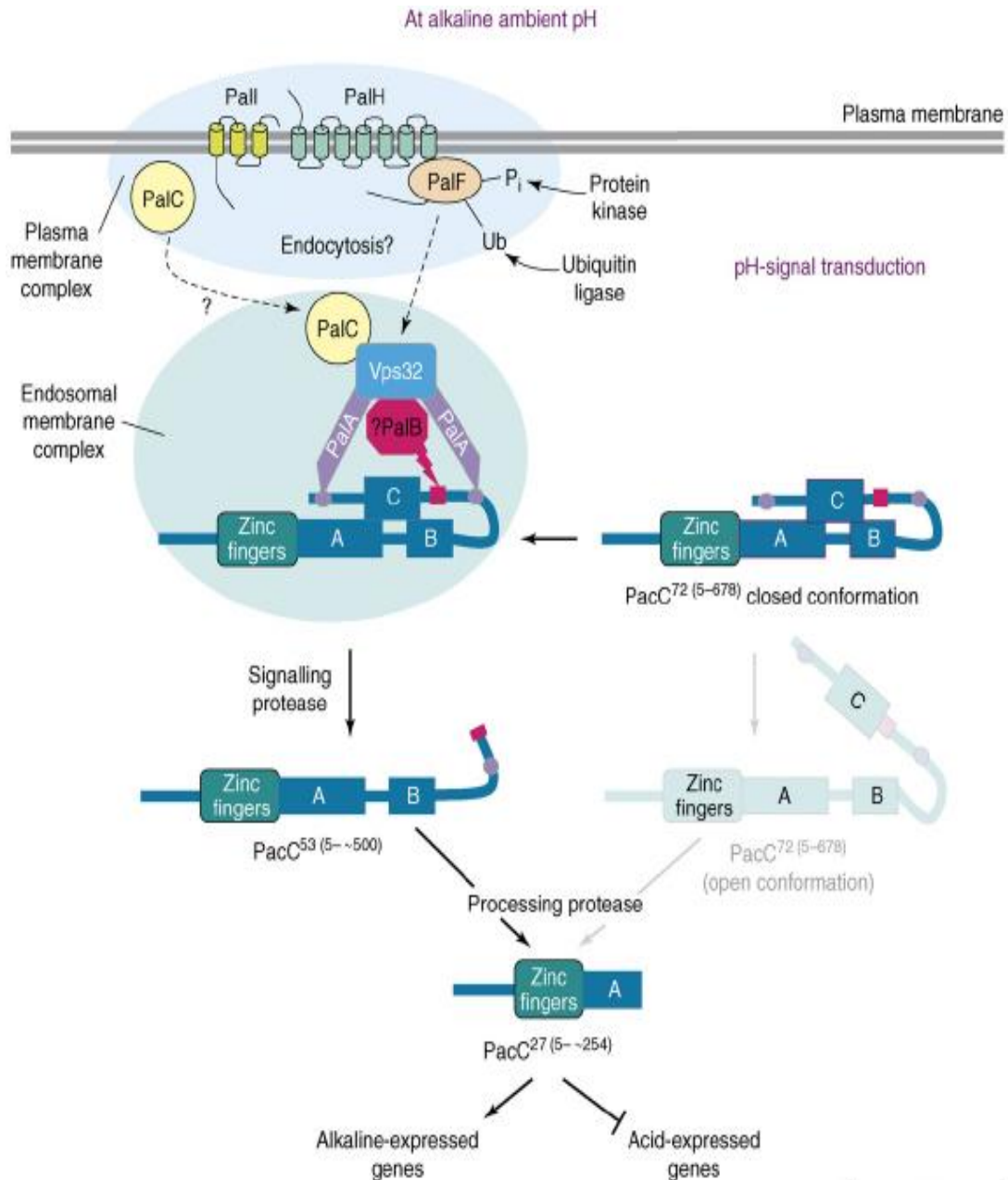
Dentre os genes regulados por PacC estão aqueles que codificam permeases, enzimas (proteases e fosfatases) e metabólitos secretados (toxinas e antibióticos) (revisto por Selvig & Alspaugh, 2011). A regulação em resposta ao pH foi descrita em diversos outros fungos, entre eles, *Saccharomyces cerevisiae* (Rim101) (Su & Michel, 1993), *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins & Dickman, 2001), *Candida albicans* (Davis, 2003), *Wangiella dermatitidis* (Wang & Szanislo, 2009) e *Cryptococcus neoformans* (O'Meara *et al.*, 2010). Nosso grupo de pesquisa identificou no fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* a existência de gene homólogo ao *pacC* (Aguiar, 2006). Verificamos ainda que esse fator pode estar relacionado a transcrição de genes relacionados à virulência desse organismo (Costa, 2011).

A participação de PacC foi descrita na regulação da expressão de genes de xilanase em *A. nidulans*. Na presença de D-xilose, *xlnA* é expresso em pH alcalino, enquanto que *xlnB*, em condições ácidas (MacCabe *et al.*, 1998). Mello-de-Sousa e colaboradores (2011) mostraram o efeito do pH sobre a expressão de celulases e de uma xilanase de *Hgvt*. Foi observado que a expressão desses genes foram fortemente induzida em pH alcalino em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Além de *pacC*, que codifica o fator transcricional acima citado, os produtos de seis genes adicionais estão envolvidos nesse sistema regulatório: *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *palI*. Caddick e colaboradores (1986) mostraram que mutações nos genes

*pal* em *A. nidulans* levam a expressão de genes característicos do crescimento em ambientes ácidos, independentemente do pH do ambiente. Esse efeito é também observado com a mutação com perda de função em *pacC* (Tilburn *et al.*, 1995). A interrupção do gene *palH* em *A. oryzae* provocou diminuição significativa na expressão de *pacC* e na atividade da fosfatase alcalina Alp (Dohmoto *et al.*, 2010). Esse fator transcricional também parece estar envolvido na regulação da formação de conídios em *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995) e em espécies de *Trichoderma* (Steyaert *et al.*, 2010).

O mecanismo de ativação de PacC proposto em *A. nidulans* envolve uma via de sinalização complexa iniciada na membrana plasmática onde estão presentes as proteínas PalH, PalI e a arrestina PalF. PalI possivelmente participa na localização de PalH na membrana (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007). Em condições ácidas, a forma completa da proteína é predominante (PacC<sup>72</sup>, com massa molecular de 72KDa) e em condições neutras a alcalinas, PacC<sup>72</sup> passa por um processo de duas clivagens (Diez *et al.*, 2002) sendo a primeira dependente e a segunda independente do pH (**Fig. 4**). Em condições alcalinas e neutras, PalF é fosforilado e ubiquitinado resultando na endocitose do complexo PalH/PalF. Uma vez endocitado, o complexo interage com proteínas sinalizadoras, provavelmente com o complexo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). PalC pode também mediar a interação entre esses dois complexos. PalA interage com a porção C-terminal de PacC e com a protease PalB, o que resulta na primeira clivagem de PacC (revisto por Selvig & Alspaugh, 2011). Nesta clivagem, 180 resíduos de aminoácidos são removidos da porção C-terminal dando origem ao PacC<sup>53</sup> (como massa molecular de 53KDa), permitindo a localização deste no núcleo. A segunda clivagem remove mais 245 resíduos de aminoácidos deixando a região de dedo de zinco intacta e levando à forma ativa PacC<sup>27</sup> (com massa molecular de 27KDa) que atua na regulação gênica. Em condições ácidas, a conformação de PacC<sup>72</sup> possivelmente impede o acesso ao proteossoma. No homólogo a PacC em *S. cerevisiae*, Rim101, essa segunda clivagem não ocorre. Acredita-se ainda que as versões clivada e intermediária de PacC sejam capazes de atuar na regulação gênica. Neste caso, uma forma atua como ativadora e a outra como repressora. Isso poderia explicar o porquê de Rim101 de *S. cerevisiae* atuar somente como repressor e PacC de *A. nidulans* atuar tanto como ativador quanto repressor. Entretanto, ainda não foi demonstrado que a forma intermediária de PacC seja funcional (revisto por Selvig & Alspaugh, 2011).



**Figura 4.** Mecanismo de regulação em resposta a pH em *A. nidulans*. O mecanismo de regulação por pH envolve a ativação do fator transcrricional PacC. Em ambientes ácidos encontra-se predominantemente a conformação fechada da proteína (PacC<sup>72</sup>). Em condições alcalinas, propõe-se a endocitose de PalH e PalF para o complexo de membrana endossomal, onde PacC, associado a PalA, sofre hidrólise por PalB, resultando na conformação aberta PacC<sup>53</sup> passível de ser processado pelo proteossoma dando origem a forma ativa PaCC<sup>27</sup> (Peñalva *et al.*, 2008).

A proteína PacC apresenta três domínios em dedos de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> em sua estrutura, dos quais apenas os dedos dois e três entram em contato direto com o

DNA (Diez *et al.*, 2002). Mignot e colaboradores (2001) demonstraram que a localização intracelular de PacC é influenciada pelo pH ambiental. A forma não processada, e em conformação fechada, está presente no citoplasma. Em condições alcalinas, a interação entre a região C-Terminal e o restante da proteína é rompida, o que leva à sua conformação aberta, possibilitando a clivagem proteolítica como proposto por Espeso e colaboradores (1997). A forma processada, por sua vez, é encontrada no núcleo da célula.

Trevisan e colaboradores (2011) mostraram que a transcrição de PacC é modulada por variações dos nutrientes carbono e fosfato, além do pH. Essa regulação envolve o *splicing* alternativo de *palB*, proteína possivelmente envolvida na primeira clivagem da proteína PacC. Esses dados indicam novos aspectos dos mecanismos envolvidos na expressão de PacC em *A. nidulans* e provavelmente em outros fungos filamentosos.

Em *A. nidulans*, PacC reconhece a sequência nucleotídica 5'-GCCA(A/G)G-3' (Espeso *et al.*, 1997). Análises genômicas e de sequências de cDNA mostraram que o gene *pacC* de *Hgvt* contém 2111pb de ORF interrompida por dois íntrons de 98 e 93pb (Aguiar, 2006). Análise de *Southern-blot* mostrou ainda que o gene está em cópia única no genoma (Poças-Fonseca *et al.*, 2008).

## 1.7 CreA

Os fungos filamentosos são caracterizados por um metabolismo versátil que os tornam capazes de utilizar diversas fontes de carbono para o seu desenvolvimento, tais como celulose, xilana, pectina, álcoois e aminoácidos (Strauss *et al.*, 1999). Um dos mecanismos desenvolvidos por muitos desses microrganismos foi o ajuste metabólico às condições do ambiente de acordo com fontes de carbono disponíveis.

A repressão por carbono é um sistema regulatório no qual, fontes de carbono mais facilmente utilizadas, tais como a glicose, atuam reprimindo a síntese de enzimas necessárias para o metabolismo de fontes de carbono alternativas (Dowzer & Kelly, 1989). Dentre os sistemas eucariotos, *creA*, de *A. nidulans*, é o exemplo mais conhecido de um gene regulador global que media essa repressão. Ruijter e Visser (1997) atribuem a esse mecanismo um papel benéfico sob o ponto de vista fisiológico da célula

por ser energeticamente mais favorável pela utilização de fontes mais simples de carbono e evitar a síntese de agentes catabólicos desnecessários.

A repressão mediada por CreA pode ocorrer de forma direta ou indireta, uma vez que esse fator pode se ligar a regiões promotoras dos genes impedindo a transcrição destes ou ainda reprimir a transcrição de fatores transcripcionais necessários para a expressão de tais genes, como foi observado para XlnR, o ativador transcripcional em *A. nidulans* (Tamayo *et al.*, 2008).

O gene *creA*, que codifica a proteína de mesmo nome, foi clonado primeiramente do fungo *A. nidulans* (Dowzer e Kelly, 1989). O polipeptídeo correspondente apresenta 415 resíduos de aminoácidos, contém dois dedos de zinco da classe Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> e uma região rica em alanina, característica de proteínas regulatórias e de ligação ao DNA. A sequência de aminoácidos da região de dedo de zinco apresenta 84% de similaridade ao da proteína Mig1, relacionada à repressão por carbono em leveduras (Dowzer e Kelly, 1991). A sequência reconhecida por essa proteína é 5'-SYGGRG-3', sendo S uma citosina ou guanina, Y uma citosina ou uma timina e R uma adenina ou guanina (Cubero e Scazzocchio, 1994).

O gene *creA* de *H. grisea* foi isolado por Takashima e colaboradores (1998) utilizando parte da sequência do gene homólogo *cre1* de *T. reesei*. A proteína apresenta uma região dedo de zinco bastante similar a das proteínas Cre1 de *T. reesei*, CREAs de *A. nidulans* e MIG1 de *S. cerevisiae*. Nesse mesmo trabalho, foi possível a detecção, por meio de ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA), da interação de CreA nas regiões promotoras dos genes de *egl1* e *exo1*.

O envolvimento de CreA na repressão dependente de carbono foi relatada no metabolismo de etanol (Kulmburg *et al.*, 1993) e na utilização de prolina (Cubero & Scazzocchio, 1994) em *A. nidulans*, e também na expressão de genes de celulases, hemicelulases e pectinases em *A. nidulans* e *T. reesei* (revisado por Aro *et al.*, 2005). A deleção de parte do gene de *creA* na linhagem Rut-C30 de *T. reesei*, incluindo a sequência que codifica um dos dedos de zinco, levou a uma hiperprodução de celulases por esse organismo (Ilmén *et al.*, 1996).

Segundo Portnoy e colaboradores (2011), apesar de diversos genes mostrarem estar sob o controle de CreA/Cre1, os mecanismos de regulação desse fator ainda são

pouco compreendidos. Este estudo também aponta que a função de CRE1 pode ser dependente da taxa de crescimento do fungo, o que sugere que a fisiologia das células afeta a função de CRE1 de diferentes formas para diferentes genes.

## 1.8 Região promotora dos genes de celulase

A análise da região promotora dos genes de celulase é uma etapa importante para a compreensão dos mecanismos de regulação desses genes. Uma vez que esse processo seja reconhecido, será possível estabelecer as condições apropriadas para a produção de maneira mais eficiente dessas enzimas.

Dentre as diferentes técnicas de engenharia genética que vem sendo desenvolvidas a fim de aumentar a produtividade e a atividade das celulases está a utilização de promotores fortes para aprimorar a expressão de genes codificadores de hidrolases. Zhang e colaboradores (2010) utilizaram o promotor de celobiohidrolase I, enzima que representa 60% de todas as proteínas secretadas por *T. reesei*, para a superexpressão do gene de  $\beta$ -glicosidase I no mesmo organismo. Rahman e colaboradores (2009) utilizaram os promotores de *egl3* e *xyn3* no controle da  $\beta$ -glicosidase I em *T. reesei* o que resultou em maior acúmulo de transcritos da celulase e conseqüentemente em um aumento de 4 e 7.5 vezes da atividade da  $\beta$ -glicosidase em relação à linhagem parental.

A sequência da região promotora do gene *egl3* de *T. reesei* foi obtida e clonada a fim de elucidar os mecanismos de indução do promotor utilizando-se o gene GUS, que codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase, como repórter (Shida *et al.*, 2008). Deleções em sequências no interior do promotor afetaram a expressão do gene e por meio de ensaio de retardo de mobilidade eletroforética foi possível identificar possíveis fatores envolvidos na regulação do promotor.

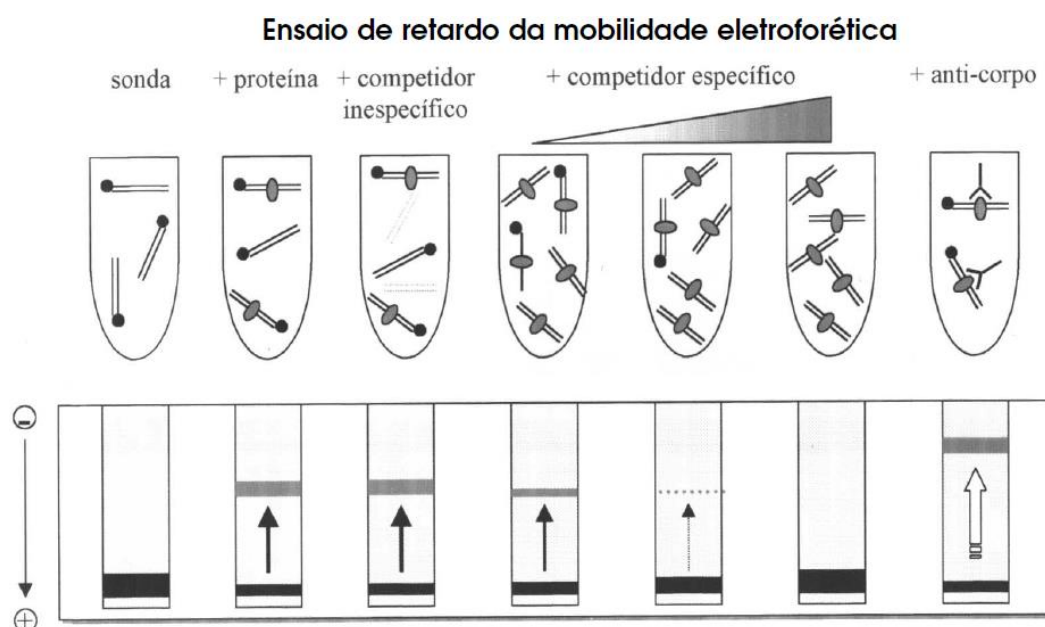
Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa revelaram o perfil de expressão de diferentes genes de celulase e de uma xilanase de *Hgvt* em diferentes condições de cultivo, demonstrando que o sistema celulolítico deste fungo é sujeito a regulação por glicose e também é dependente do pH do meio (Mello-de-Souza *et al.*, 2011). Um estudo mais detalhado da região promotora dos genes de celulase podem trazer informações adicionais a respeito da regulação do complexo celulolítico desse fungo.



## 1.9 Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA)

O ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) é uma técnica *in vitro* relativamente simples que permite a detecção da interação entre DNA e proteína. Esse método permite a dedução de parâmetros de ligação e afinidades relativas de uma proteína a um ou mais sítios presentes no DNA ou de afinidades distintas de diferentes proteínas a um mesmo sítio (revisto por Dey *et al.*, 2012).

A técnica, também denominada de *Band-shift*, baseia-se na alteração da mobilidade eletroforética de um ácido nucléico quando uma proteína a este se liga (**Fig. 5**). Para isso, a proteína de interesse é incubada com sondas marcadas e submetidas à eletroforese não desnaturante. Enquanto a sonda livre apresenta uma maior mobilidade no gel, o complexo DNA-proteína move-se mais lentamente (Lin & Barbosa, 2002). Ensaio utilizando anticorpos específicos para a proteína em questão podem ser realizados a fim de confirmar a interação, sendo o complexo DNA-Proteína-Anticorpo chamado *supershift*.



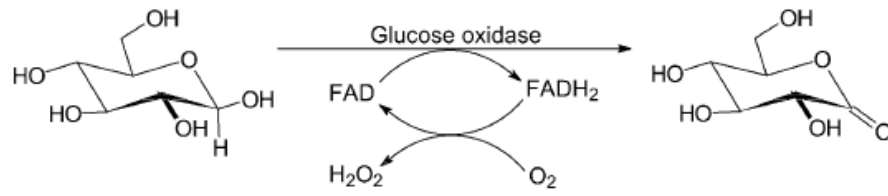
**Figura 5.** Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética. A interação entre DNA e proteína é observada quando há formação de uma banda de menor mobilidade no gel (*shift*) em relação à sonda livre. A especificidade da ligação é analisada utilizando-se competidores pela proteína na reação (Lin & Barbosa, 2002).

A fim de verificar se a interação DNA-proteína é específica, são realizados ensaios de competição. Nesses experimentos são utilizados dois tipos de sondas não marcadas. A primeira apresenta sequência idêntica à da sonda marcada, contendo o sítio de reconhecimento da proteína (competidor específico), e a segunda apresenta mutações no sítio de reconhecimento para a proteína (competidor inespecífico). Em cada ensaio, utilizam-se concentrações molares crescentes dos competidores. Em uma interação específica, o sinal da banda relativa à interação DNA-Proteína será gradativamente menor, ou mesmo inexistente, na presença de competidores específicos, pois esses em concentrações superiores à da sonda marcada recrutam a proteína de ligação. Por outro lado, o sinal permanece inalterado quando competidores inespecíficos estão presentes.

### 1.10 Gene repórter

O sistema gene repórter é uma ferramenta empregada para a análise de expressão gênica. Essa tecnologia envolve a inserção de uma sequência de nucleotídeos definida que, quando introduzida num sistema biológico, gera um fenótipo prontamente mensurável (Wood, 1995). Essa metodologia tem sido aplicada em estudos de localização e tráfego de proteínas *in vivo* e de regiões regulatórias de genes. Para esta análise, regiões regulatórias são introduzidas a montante do repórter. Dessa maneira, por meio da detecção direta do produto de expressão, são investigadas as condições de expressão do gene de interesse. Os sistemas mais comumente utilizados empregam os genes de  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*), luciferase (*luc*) e proteína fluorescente verde (*gfp*) (revisto por Ghim *et al.*, 2010).

O sistema repórter GOX (pGOX), construído pelo nosso grupo de pesquisa, utiliza o gene *goxA* de *A. niger* como repórter. Esse gene codifica a enzima glicose oxidase que catalisa a oxidação de D-glicose em gliconolactona e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Fig. 6**). Uma segunda reação envolvendo o peróxido de hidrogênio gera um produto fluorescente, detectável por espectrofotometria (Mach *et al.*, 1999).



**Figura 6.** Mecanismo catalítico da enzima glicose oxidase (Leskovac *et al.*, 2005)

# **JUSTIFICATIVA**

---

## 2. JUSTIFICATIVA

O interesse na utilização da biomassa vegetal para a geração de energia e de produtos de maior valor agregado tem impulsionado pesquisas na área de biotecnologia de enzimas celulolíticas com objetivo de aprimorar a produção, bem como promover uma maior eficiência catalítica nos processos industriais.

O fungo *Hgvt* tem sido alvo de estudo do nosso grupo de pesquisa por muitos anos e é um organismo com grande potencial para a produção de enzimas celulolíticas de interesse industrial. Entretanto, o conhecimento a respeito da regulação da expressão gênica, em especial de genes de celulases, desse fungo é ainda muito limitado. Diante desse potencial e do interesse na utilização dessas enzimas industrialmente, este trabalho propõe a caracterização estrutural de promotores dos genes de celulase de *Hgvt* visando ao aumento da expressão desses genes. Optamos iniciar a caracterização inicial de promotores com os genes *egl1* e *egl4*, pois estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que eles obedecem a mecanismos regulatórios distintos. Enquanto o primeiro é expresso em condições alcalinas e sujeito a repressão por glicose, o segundo é expresso em condições ácidas e não sofre essa repressão.

## **OBJETIVOS**

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo a análise estrutural dos promotores dos genes de celulase *egl1* e *egl4* do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Amplificação da região promotora dos genes por meio de PCR;
2. Clonagem dos promotores *egl1*, *egl4* e *cbh1.1* no vetor gene repórter pGOX visando a posterior análise funcional em sistema heterólogo de *A. nidulans*;
3. Análise das regiões promotoras dos genes *egl1* e *egl4* quanto a presença de sítios de reconhecimento dos fatores transcricionais CreA e PacC;
4. Realização de ensaios de retardo de mobilidade eletroforética para avaliar a interação entre os fatores transcricionais CreA e PacC e os possíveis sítios de ligação detectados nos promotores dos genes de celulase.

**MATERIAL  
E MÉTODOS**

---



## 4. MATERIAL

### 4.1 Microrganismos

#### 4.1.1 Hgvt

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi cultivado em meio de aveia 4% e pH 7,2 a temperatura de 42°C.

#### 4.1.2 *E.coli*

A linhagem XL10 Gold (Stratagene) foi utilizada para transformação com o vetor de clonagem pGEM-T easy e a XL1 Blue (Stratagene) com o vetor pGOX contendo o promotor de *egl1*. A produção dos domínios de ligação de CreA e PacC foram produzidos em BL21 (DE3)(Novagen). Os genótipos das células utilizadas são os seguintes:

- XL1 Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac1<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*];
- XL 10 Gold: Tet<sup>r</sup>  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$  [F' *proAB lac1<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10*];
- BL21(DE3): F' *dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ(DE3)*.

### 4.2 Soluções e meios para cultura de microrganismos

#### 4.2.1 Soluções e meios de cultura para *E.coli*

##### 4.2.1.1 Meio Luria-Bertani (LB), pH 7,2

Peptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
HCL	1%

##### 4.2.1.2 Meio LB-ágar

Meio LB adicionado de 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico.

#### 4.2.1.3 Solução de Ampicilina (50mg/mL)

Ampicilina	0,5g
Água destilada	10mL

Esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22µm

#### 4.2.1.4 Solução de Cloranfenicol (40mg/mL)

Cloranfenicol	0,4g
Água destilada	10mL

Esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22µm

#### 4.2.1.5 Solução de Tetraciclina (20mg/ml)

Tetraciclina	0,2g
Água destilada	10mL

Esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22µm

#### 4.2.1.6 Solução de IPTG (100mM)

IPTG	0,2g
Água	5mL

#### 4.2.1.7 Solução de X-Gal 2%

X-Gal	0,2g
Dimetilformamida	10mL

### 4.2.2 Soluções e meios de cultura para *Humicola grisea*

Aveia Quacker®	4%
Ágar bacteriológico	1,5%
Água da torneira	q.s.p 1L

#### 4.2.2.1 Solução de sais

KCl	26g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	10g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	76g
Água destilada	q.s.p. 1L

Ajustar pH para 7,2.

#### 4.2.2.2 Solução de elementos traço

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -10H <sub>2</sub> O	40mg
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	400mg
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	714mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	800mg
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	8 mg
Água destilada	q.s.p. 1L

Ajustar o pH para 2,0 com HCl.

#### 4.2.2.3 Meio Mínimo (MM) (Pontecorvo *et. al*, 1953)

Solução de sais	20 mL
Glicose (p/v)	1%
Água destilada	q.s.p 1L

Ajustar o pH para 6,8 com NaOH.

### 4.3 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

#### 4.3.1 Tampão de corrida (5X), pH 8,3

Tris-base	125mM
Glicina	0,96M
SDS	0,5% (p/v)

#### 4.3.2 Tampão de amostra (5X)

Tris-HCl pH 6,8	60mM
SDS	2,0% (p/v)
Glicerol	25% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
B-mercaptoetanol	14,4mM

### **4.3.3 Solução corante**

Azul brilhante de Comassie R-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

### **4.3.4 Solução descorante**

Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

### **4.3.5 Solução de poliacrilamida 30% (Acrilamida/Bisacrilamida 29:1)**

Acrilamida	29%
Bisacrilamida	1%

A solução foi acrescida de água destilada, filtrada e protegida da luz.

## **4.4 Soluções para o Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA)**

### **4.4.1 Solução de Poliacrilamida (vide 3.4.5)**

### **4.4.2 Solução de alta concentração de sal**

Trizma Base	0,06 g
EDTA	0,02 g
NaCl	4,30 g

Adicionou-se água destilada para 50 mL de volume final.

### **4.4.3 Solução TEB (10X)**

Trizma Base	54,0 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA	15,0 g

Adicionou-se água destilada para 500 mL de volume final e o pH foi ajustado para 8.

## **4.5 Soluções para a purificação de proteínas**

DTT	0,5 mM
PMSF	1,0 mM

Pepstatina	1,0 $\mu\text{M}$
Leupeptina	0,6 $\mu\text{M}$

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os parâmetros utilizados para as reações de PCR foram os seguintes: dNTP 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, oligonucleotídeo 0,2μM, 0,5 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) por reação e tampão 1X. As condições de PCR utilizadas foram: ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto seguido de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. O ciclo final de extensão foi de 72°C por 5 minutos. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para PCR estão listados abaixo (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR das regiões 5'UP.

EGL15UPf	TTCTAGAATTCGGTTCGTCAACGTC (Takashima <i>et al.</i> , 1996)
EGL15UPr	GTCTAGAGGTTGTTTGAGCTGGTGCG (Takashima <i>et al.</i> , 1996)
EGL45UPf	GTCTAGAGCCACATGGTTTGCTTTCAT (Takashima <i>et al.</i> , 1999)
EGL45UPr	GGTCAGGGGGAGCTGCATCTAGAG (Takashima <i>et al.</i> , 1999)
CBH1.15UPf	GTCTAGAGCACATCACTGGCAAAGCTA (Azevedo <i>et al.</i> , 1990)
CBH1.15UPF2	TCTAGAGCCTTGCCCAGAACAG (Azevedo <i>et al.</i> , 1990)

### 5.2 Transformação de células de *E. coli* por choque térmico

O protocolo de transformação utilizado foi de acordo com Sambrook & Russel (2001) no qual uma colônia individual de *E. coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB com o antibiótico apropriado e cultivada por aproximadamente 18h a 37°C sob uma agitação de 250 rpm. Desse pré-inóculo, 500μl foram transferidos para 50mL de meio LB e incubado sob agitação a 37°C até ser atingida a OD<sub>600</sub> de 0,2 a 03. A cultura foi resfriada no gelo por 15 minutos e coletada por centrifugação a 5000 x g a 4°C por 10 minutos. O sedimento ressuspenso em 10 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 100 mM e glicerol 15% gelada com uma suave agitação permaneceu por 15 minutos no gelo. A cultura foi coletada por centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sedimento foi ressuspenso em 1mL da solução de CaCl<sub>2</sub> e Glicerol e divididos em alíquotas de 100 μL de células. À essa alíquota foram adicionados 10μL do sistema de ligação que foi novamente incubado em gelo por 60 minutos. As células foram submetidas ao choque térmico por 90 segundo a 42°C e em seguida, resfriadas no gelo. Adicionou-se 1mL de

meio LB sem antibiótico e incubou-se a 37°C por uma hora sob agitação. Transcorrido esse tempo, as células foram semeadas em placa de petri contendo ampicilina 100µg/mL, e se necessários, X-Gal 0,004% e IPTG 0,2mM. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C.

### **5.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala**

Uma colônia transformante de bactéria foi inoculada em 5mL de meio LB com ampicilina 100µg/mL e crescido a 37°C por 18 horas a sob agitação. A cultura foi coletada por centrifugação por 2 minutos a 10.000 x g e ressuspensa em 200µL da solução 1 (Tris-HCl 25mM, pH 8,0; EDTA 10mM, pH 8,0; Glicose 50mM). Adicionou-se 360µL da solução 2 preparada na hora (NaOH 0,2M e SDS 10%), misturou-se por suave inversão e incubou-se à temperatura ambiente por no máximo 5 minutos quando então foi adicionado 300µL da solução 3 (acetato de sódio 3M e ácido acético 2M, pH entre 4-8 e 5,0). A solução foi incubada no gelo por 5 minutos, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionou-se 750µL de isopropanol e foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200µL da solução 1 contendo RNase 50µg/mL. O tubo foi incubado a 37°C por 30 minutos e a este foi adicionado acetato de amônio 7,5M. Misturou-se vigorosamente e a solução foi centrifugada a 10.000 por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e precipitado com 750µL etanol 100%. Novamente o material foi centrifugado a 10.000 x g por 2 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Após a última lavagem, deixou-se secar o *pellet* o qual foi ressuspensão em 50µL de água.

### **5.4 Extração de DNA plasmidial em média escala**

Um clone de bactéria foi inoculado em 300mL de meio LB com ampicilina 100µg/mL e crescido a 37°C por 18 horas a sob agitação. A cultura foi coletada por centrifugação por 2 minutos a 10.000 x g e ressuspensa em 2mL da solução 1 (Tris-HCl 25mM, pH 8,0; EDTA 10mM, pH 8,0; Glicose 50mM). Adicionou-se 3,6mL da solução 2 preparada na hora (NaOH 0,2M e SDS 10%), misturou-se por suave inversão e incubou-se à temperatura ambiente por no máximo 5 minutos quando então foi

adicionado 3mL da solução 3 (acetato de sódio 3M e ácido acético 2M, pH entre 4-8 e 5,0). A solução foi incubada no gelo por 5 minutos seguida de centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionou-se 1 volume de isopropanol e foi centrifugado a 12.300 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2mL da solução 1 contendo RNase 50µg/mL. O tubo foi incubado a 37°C por 30 minutos e posteriormente a este foi adicionado acetato de amônio 7,5M. Misturou-se vigorosamente e a solução foi centrifugada a 12.300 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e precipitado com 7,5mL etanol 100%. Novamente o material foi centrifugado a 12.300 x g por 10 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Após a última lavagem, deixou-se secar o *pellet* o qual foi ressuspenso em 50µL de água.

### 5.5 Isolamento da região 5' UP dos genes de celulases

A região 5' UP não codante dos genes de celulases de *Humicola grisea* foram isoladas do DNA genômico do fungo através de reação de PCR utilizando iniciadores específicos (Tabela 1). O *amplicon*, purificado com kit Illustra GFP PCR DNA and Gel Purification (GE Healthcare), foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T *easy* (Promega). O sistema de ligação foi utilizado na transformação da linhagem XL10 Gold® de *E.coli* pelo método de choque térmico com CaCl<sub>2</sub>. A purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Para a liberação do inserto referente à região promotora dos genes foi realizada digestão com a enzima *XbaI* (Promega) por quatro horas a 37°C utilizando-se 5 unidades da enzima para 300 ng de DNA.

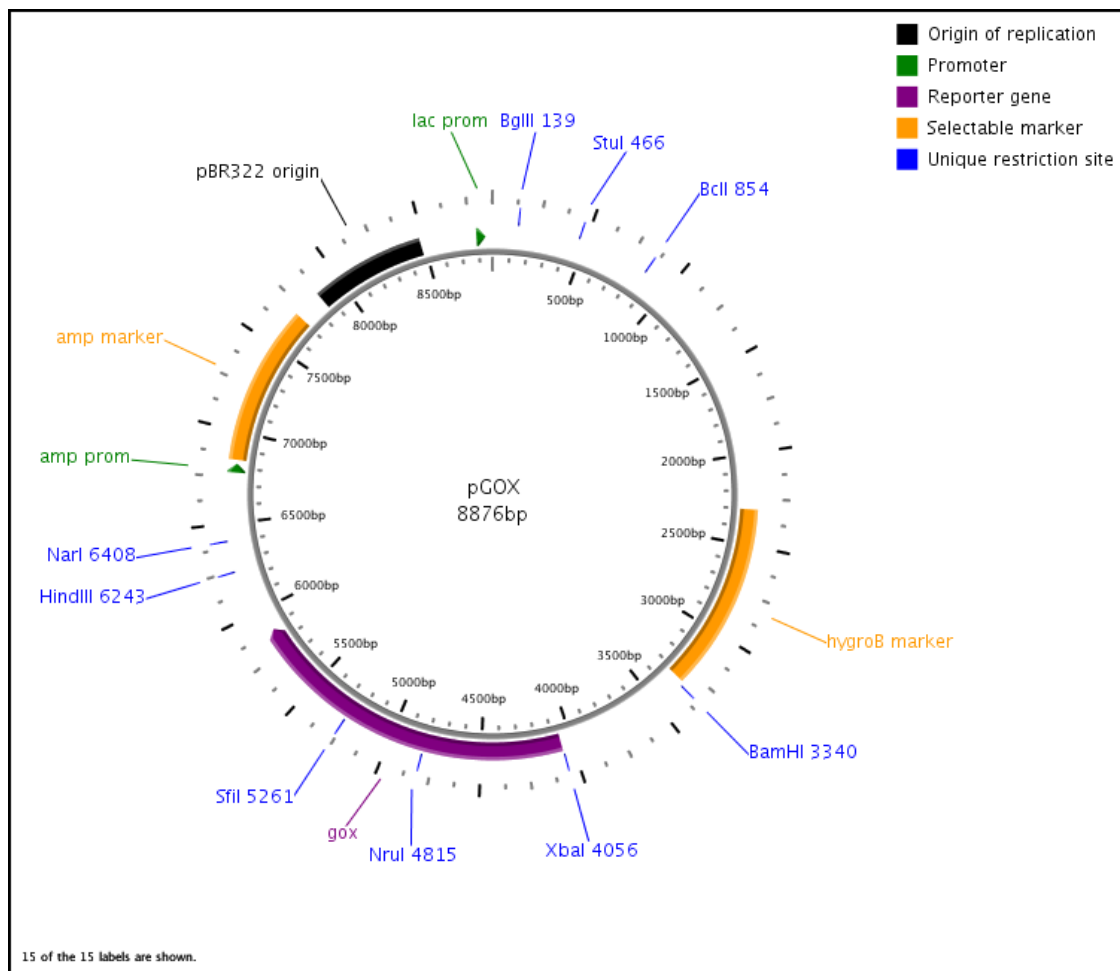
### 5.6 Clonagem no vetor gene repórter GOX

O vetor pGOX (**Fig. 7**), previamente construído por nosso grupo de pesquisa, (Bárbara Menezes e Thiago Mello de Sousa, comunicação pessoal) foi obtido a partir dos vetores pSJ3 (Mach *et al.*, 1999) e pAN7-1(Punt *et al.*, 1987) e apresenta aproximadamente 9kb. O gene *gox* (glicose oxidase) de *Aspergillus niger* com 2,3 kb de região codante mais 367 pares de base da região 3' não codante foram extraídos do



vetor pSJ3 por meio de digestão com as endonucleases de restrição *XbaI* e *HindIII*. Esse fragmento foi inserido no vetor pAN7-1 previamente linearizado pelo mesmo conjunto de enzimas. Esse vetor possui o gene *hph* (higromicina fosfotransferase) sob o controle de *gpdA* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *A. nidulans* o que confere resistência a higromicina.

As regiões promotoras dos genes contendo sítios de *XbaI* em ambas as extremidades foram inseridos nesse mesmo sítio no vetor pGOX de forma a controlar o gene *gox*.



**Figura 7.** Mapa do vetor pGOX (Bárbara Menezes e Thiago Mello de Sousa, comunicação pessoal)

Previamente à clonagem, o vetor pGOX foi linearizado utilizando-se a enzima *XbaI* (Vivantis) e defosforilado pela enzima *SAP* – *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Promega) a fim de evitar o religamento deste.

Para a ligação dos promotores no gene repórter foi utilizada 5 partes do primeiro para 1 parte do segundo (250ng do vetor e 70 ng do inserto). Em ambas as reações

foram utilizadas 5 U da enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen), tampão de reação 1 X, incubação a 4°C por 18 horas.

Seguiu-se com a transformação por choque térmico da linhagem XL1Blue® de *E.coli* e purificação dos plasmídeos em pequena escala. Para a confirmação da presença do inserto no vetor foram realizadas reações de PCR com oligonucleotídeos específicos. Para a verificação da orientação correta do inserto no vetor foi realizada uma digestão com a enzima de restrição *Eco/RI*. As digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

### **5.7 Análise da região 5'UP do gene *egl1***

A região promotora do gene foi analisada *in silico* quanto a presença de sítios de ligação para os fatores transcricionais PacC e CreA. Buscou-se sequências consenso 5'-GCCARG-3' (Tilburn *et al*, 1995; Espeso *et al*, 1997) reconhecidas por PacC e 5'-SYGGRG-3' (Cubero & Scazzocchio, 1994) reconhecidas por CreA.

### **5.8 Síntese de sondas para EMSA**

A partir da localização dos sítios de ligação para CreA e PacC na região promotora dos genes, foram sintetizadas sondas marcadas com fluorescência (FAM). As sequências das sondas bem como das sequências complementares e competidores estão listadas abaixo (**Tabela 2 e Tabela 3**).

**Tabela 2.** Sondas de região promotora de *egl1* utilizadas no ensaio de retardo de mobilidade eletroforética.

Sonda	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Posição no promotor
1 (PacCIHgegl1)	<i>Senso FAM</i>	ACGGGGAATT <b>CGGTTC</b> GTCAACGTCC	
	<i>anti-senso</i>	GGACGTTGACGAACCGAATCCCCGT	-523 a -
	Competidor específico	<i>senso</i> ACGGGGAATT <b>CGGTTC</b> GTCAACGTCC	549
	<i>anti-senso</i>	GGACGTTGACGAACCGAATCCCCGT	
2 (PacCIIHgegl1)	<i>Senso FAM</i>	CTCCAT <b>CTTGGCCGGCTTGGC</b> CGCCCT	
	<i>anti-senso</i>	AGGGCGGCCAAGCCGGCCAAGATGGAG	
	Competidor específico	<i>Senso</i> CTCCAT <b>CTTGGCCGGCTTGGC</b> CGCCCT	
	<i>anti-senso</i>	AGGGCGGCCAAGCCGGCCAAGATGGAG	
	Competidor mutado	<i>Senso</i> CTCCAT <b>CTAGA</b> CCGG <b>CTAGA</b> CCGCCCT	-492 a -
	<i>anti-senso</i>	AGGGCGGTCTAGCCGGTCTAGATGGAG	519
	Competidor mutado no sítio 1	<i>Senso</i> CTCCAT <b>CTAGA</b> CCGG <b>CTTGGC</b> CGCCCT	
	<i>anti-senso</i>	AGGGCGGCCAAGCCGGTCTAGATGGAG	
3 (CreAIHgegl1)	<i>Senso FAM</i>	ACCTT <b>CCGGAG</b> GAGCCGACTCCGAGCGCAC <b>GCGGAG</b> GGGCATG	
	<i>anti-senso</i>	CATGCCCTCCGCGTGCGCTCGGAGTCCGGCTCCTCCGGGAAGGT	
	Competidor específico	<i>senso</i> ACCTT <b>CCGGAG</b> GAGCCGACTCCGAGCGCAC <b>GCGGAG</b> GGGCATG	-266 a
	<i>anti-senso</i>	CATGCCCTCCGCGTGCGCTCGGAGTCCGGCTCCTCCGGGAAGGT	-310
	Competidor mutado	<i>Senso</i> ACCTT <b>CCAAAG</b> GAGCCGACTCCGAGCGCAC <b>GCAAAG</b> GGGCATG	
	<i>anti-senso</i>	CATGCCCTTTGCGTGCGCTCGGAGTCCGGCTCCTTTGGGAAGGT	
4 (CreAIIHgegl1)	<i>Senso FAM</i>	TCCCC <b>GTGGGGTCCGGGG</b> CAATGT	
	<i>anti-senso</i>	ACATTGCCCCGGACCCACGGGGA	
	Competidor específico	<i>Senso</i> TCCCC <b>GTGGGGTCCGGGG</b> CAATGT	
	<i>anti-senso</i>	ACATTGCCCCGGACCCACGGGGA	
	Competidor mutado	<i>Senso</i> TCCCC <b>GTAAAA</b> TCC <b>AAAGG</b> CAATGT	-220 a
	<i>anti-senso</i>	ACATTGCCTTGGATTTTACGGGGA	-244
	Competidor mutado no sítio 1	<i>Senso</i> TCCCC <b>GTAAAGTCCGGGG</b> CAATGT	
	<i>anti-senso</i>	ACATTGCCCCGGACCTTACGGGGA	
	Competidor mutado no sítio 2	<i>Senso</i> TCCCC <b>GTGGAATCCGGGG</b> CAATGT	
	<i>anti-senso</i>	ACATTGCCCCGGATTCCACGGGGA	
5 CreAIIHgegl1)	<i>Senso FAM</i>	ATGTA <b>ACCGGAG</b> ATT <b>GGGGCC</b> GGTTGA	
	<i>anti-senso</i>	TCAACCGCCCCCAATCTCCGTTACAT	
	Competidor específico	<i>Senso</i> ATGTA <b>ACCGGAG</b> ATT <b>GGGGCC</b> GGTTGA	-196 a
	<i>anti-senso</i>	TCAACCGCCCCCAATCTCCGTTACAT	-224
	Competidor mutado	<i>Senso</i> ATGTA <b>CCAAAG</b> ATT <b>GGGAA</b> CCGGTTGA	
<i>anti-senso</i>	TCAACCGGTTCCCAATCTTTGGTTACAT		

**Tabela 3.** Sondas de região promotora de *egl4* utilizadas no ensaio de retardo de mobilidade eletroforética.

Sonda	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Posição no promotor
1 (CreAlHgegl4)	<i>Senso FAM</i>	TCCTGCG <b>CACCTC</b> TCTCACTCCTCGACCGT <b>CCGGAG</b> TCATCC	
	<i>anti-senso</i>	GGATGACTCCGGACGGTCGAGGAGTGAGAGAGGTGCGCAGGA	
	Competidor específico	<i>senso</i> TCCTGCG <b>CACCTC</b> TCTCACTCCTCGACCGT <b>CCGGAG</b> TCATCC	
		<i>anti-senso</i> GGATGACTCCGGACGGTCGAGGAGTGAGAGAGGTGCGCAGGA	
	Competidor mutado	<i>senso</i> TCCTGCG <b>CATTTC</b> TCTCACTCCTCGACCGT <b>CCAAAG</b> TCATCC	-603 a
		<i>anti-senso</i> GGATGACTTTGGACGGTCGAGGAGTGAGAGAAATGCGCAGGA	-645
	Competidor mutado no sítio 1	<i>senso</i> TCCTGCG <b>CATTTC</b> TCTCACTCCTCGACCGT <b>CCGGAG</b> TCATCC	
		<i>anti-senso</i> GGATGACTCCGGACGGTCGAGGAGTGAGAGAAATGCGCAGGA	
	Competidor mutado no sítio 2	<i>senso</i> TCCTGCG <b>CACCTC</b> TCTCACTCCTCGACCGT <b>CCAAAG</b> TCATCC	
		<i>anti-senso</i> GGATGACTTTGGACGGTCGAGGAGTGAGAGAGGTGCGCAGGA	
2 (CreAlIHgegl4)	<i>Senso FAM</i>	ACCGT <b>CCGGAG</b> TCATCCGAATAGCGGC <b>CACCC</b> CCTCCC	
	<i>anti-senso</i>	GGGAGGGGGGTGCCGCTATTCGGATGACTCCGGACGGT	
	Competidor específico	<i>Senso</i> ACCGT <b>CCGGAG</b> TCATCCGAATAGCGGC <b>CACCC</b> CCTCCC	
		<i>anti-senso</i> GGGAGGGGGGTGCCGCTATTCGGATGACTCCGGACGGT	
	Competidor mutado	<i>Senso</i> ACCGT <b>CCAAAG</b> TCATCCGAATAGCGGC <b>CATTCC</b> CCTCCC	-582 a
		<i>anti-senso</i> GGGAGGGGAATGCCGCTATTCGGATGACTTTGGACGGT	-620
	Competidor mutado no sítio 1	<i>Senso</i> ACCGT <b>CCAAAG</b> TCATCCGAATAGCGGC <b>CACCC</b> CCTCCC	
		<i>anti-senso</i> GGGAGGGGGGTGCCGCTATTCGGATGACTTTGGACGGT	
Competidor mutado no sítio 2	<i>Senso</i> ACCGT <b>CCGGAGT</b> TCATCCGAATAGCGGC <b>CATTCC</b> CCTCCC		
	<i>anti-senso</i> GGGAGGGGAATGCCGCTATTCGGATGACTCCGGACGGT		
3 (PacCIHgegl4)	<i>Senso FAM</i>	TGCATGGAAATTGG <b>CCTGGC</b> TGCGCGTCAA	
	<i>anti-senso</i>	TTGAGCGCGCAGCCAGGCCAATTTCCATGCA	-340 a
	Competidor específico	<i>senso</i> TGCATGGAAATTGG <b>CCTGGC</b> TGCGCGTCAA	-371
		<i>anti-senso</i> TTGAGCGCGCAGCCAGGCCAATTTCCATGCA	

## 5.9 Anelamento das sondas

Para o anelamento das sondas, foram utilizados 500ng da sonda marcada e a mesma quantidade da sua sequência complementar, adicionados de 6µL de tampão de anelamento (Tris-HCL 1M, pH 7,7) num volume final de 30µL completados com água MiliQ. A reação foi aquecida a 95°C por 5 minutos e resfriadas naturalmente até atingir a temperatura ambiente.

## 5.10 Purificação das sondas

A reação de anelamento foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida para a remoção de oligonucleotídeos auto-anelados, fita-simples e produtos de degradação. Para isso, a amostra foi dividida em três alíquotas que foram aplicadas em poços previamente lavados no gel. Após a eletroforese, fez-se marcações na lateral do gel seguida da leitura no scanner Typhoon 9410 (GE Healthcare). Os parâmetros para leitura foram: filtro fluoresceína 526SP, intensidade 600 PTM, sensibilidade média, *pixel size* 200 microns e plano focal *platen*. A banda referente a sonda dupla-fita é removida do gel com ajuda de um bisturi, depositada sobre uma camada de cerca de 3mm de agarose 1% previamente polimerizada e coberta com agarose fundida. Após a solidificação, faz-se uma perfuração na agarose com o bisturi, logo abaixo dos fragmentos de poliacrilamida, onde é encaixado um fragmento de membrana DEAE celulose (*Schleicher & Schuell*, Dassel-Alemanha). O gel é submetido à voltagem e após a passagem total das bandas para a membrana, esta é então transferida para tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, coberta com 250  $\mu$ L de solução de alto sal e incubada a 45°C por 20 minutos. A solução de sais foi transferida para novo tubo e repetiu-se a extração com a mesma membrana. Os dois volumes foram unidos em um só frasco e precipitou-se as sondas acrescentando 1mL de etanol 100% gelado seguida de incubação a 20°C por pelo menos 30 minutos. A reação foi centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem do *pellet*, o mesmo foi ressuspenso em 30 $\mu$ L de água.

## 5.11 Produção dos domínios de ligação ao DNA das proteínas CreA e PacC

Os vetores pGEX-4T2, contendo a região codificadora dos domínios de ligação das proteínas CreA e PacC, gentilmente cedidos pelo Dr. Thiago Machado Mello de Sousa, foram utilizados para transformação bacteriana por choque térmico da linhagem BL21(DE3) de *E.coli*.

Uma cultura transformante isolada foi inoculada em 4mL de meio LB contendo ampicilina 100 $\mu$ g/mL sob agitação por 8 horas. Após esse tempo, 50 $\mu$ L dessa cultura foi transferida para 50mL de LB, com o antibiótico, durante toda a noite. Em 250mL de meio LB contendo ampicilina foi acrescentado um volume do pré-inóculo de modo a se

obter a OD<sub>600</sub> de 0,2 a 0,3. A cultura foi incubada sob agitação de 250rpm, a 37°C, até atingir a OD<sub>600</sub> de 0,6.

A indução foi realizada adicionando IPTG 0,1mM a 30°C, sob agitação, por 5 horas. As células foram recuperadas por centrifugação a 3000 x g, a 4°C por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 4mL de tampão de equilíbrio (PBS, pH 7,3) contendo inibidores de protease (Pepstatina 1μM, Leupeptina 2μM e PMSF 10μM) adicionados imediatamente antes do uso. Adicionou-se 0,1 volume de Tris-HCL 25mM, pH 8,0 contendo lisozima 10mg/mL. A solução, mantida sempre em gelo, foi submetida a sonicação por duas vezes utilizando os seguintes parâmetros: amplitude 40%, 59 segundos *pulse on* e 2 segundos *pulse off*. A solução foi centrifugada a 2350 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45μm. Cerca de 50μL do lisado foi estocado para análise em gel. A recuperação das proteínas foram realizadas por dois protocolos distintos.

### **5.12 Equilíbrio da coluna de GST-Sepharose**

A coluna GSTrap FF de 1mL (GE Healthcare) foi lavada com 25 mL de tampão de equilíbrio (PBS, pH 7,3) a uma taxa de 2mL por minuto. A essa coluna foi adicionada o lisado filtrado a uma taxa de 0,5mL por minuto. Lavou-se a mesma com 20mL de PBS e inibidores de protease a 1mL por minuto e eluiu-se as proteínas utilizando tapão de eluição (Tris-HCl 50mM, pH8,0 e Glutathione reduzida 10mM). Foram coletadas frações de 1mL às quais foram adicionadas glicerol para uma concentração final de 20%. As frações foram estocadas à temperatura de -80°C.

### **5.13 Purificação de proteínas com o Kit Glutathione sepharose 4B (Amesham Biosciences)**

A purificação por batelada foi realizada conforme instruções do fabricante. Utilizou-se 1,33mL de glutathione sepharose 4B a qual foi submetida a centrifugação a 500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e acrescentou-se 10mL de PBS gelado para lavagem. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi removido e 1mL de PBS foi adicionado o que resultou em uma matriz de 50%. Para a purificação, 2mL do lisado contendo as proteínas foi adicionada à matriz e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos, com suave agitação. Centrifugou-se

a 500 x g por 5 minutos e removeu-se o sobrenadante. A matriz de sepharose foi três vezes lavada com 10 ml de PBS. Foi utilizado 1mL de tampão de eluição (glutaciona reduzida 10mM em Tris-HCl 50mM, pH 8,0) que foi misturado gentilmente com a matriz e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, centrifugou-se por 5 minutos a 500 x g e o sobrenadante foi recolhido. Repetiu-se mais duas vezes essa etapa. As frações de proteínas foram adicionadas de glicerol para uma concentração final de 20% e estocadas a -80°C.

#### 5.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O extrato bruto da célula bem como as frações purificadas das proteínas foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito abaixo.

	Separador (12%)	Concentrador (6%)
Água destilada	1,98mL	1,7mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,5mL	-
Tris-HCl 1,0M pH 6,8	-	315µL
SDS 10%	60µL	25µL
Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1)	2,4mL	415µL
TEMED	2,4µL	2,5µL
APS 25%	24µL	10µL

Uma alíquota de 10µL adicionadas de tampão de amostra foi fervida por 5 minutos e aplicadas em gel o qual foi posteriormente corado com solução corante durante toda a noite, sob agitação, seguida de descoramento com a solução descorante.

Para as reações de EMSA, foram utilizados géis de poliacrilamida conforme descrito abaixo.

Poliacrilamida 30%	7,5mL
Glicerol 50%	7,5mL
TBE 10X	1,125mL

Água	22,5mL
TEMED	25µL
APS 25%	100µL

### 5.15 Quantificação de proteínas

A quantificação das frações proteicas foi realizada pelo método de Bradford (1976). A curva padrão de concentração foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) em concentrações que variaram de 0,1 a 1mg/mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (GeneQuant) na absorvância de 595nm.

### 5.16 Ensaio de EMSA

Para o ensaio de retardo de mobilidade foram utilizados os seguintes reagentes:

Sonda	1,5pmol/µL
KCL	200mM
ZnCl <sub>2</sub>	5µM
Poli(dIdC)	0,2µg/µL
Espermidina	8mM
Proteína	25ng/µL
Água	q.s.p. 20µL

Em cada reação, utilizou-se 0,5µg de proteína. Após adição de todos os reagentes, os frascos foram incubados em gelo por 20 minutos. Para a aplicação em gel, utilizou-se uma gota de tampão de amostra 1X e de glicerol 50% para auxiliar a corrida. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante.



# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

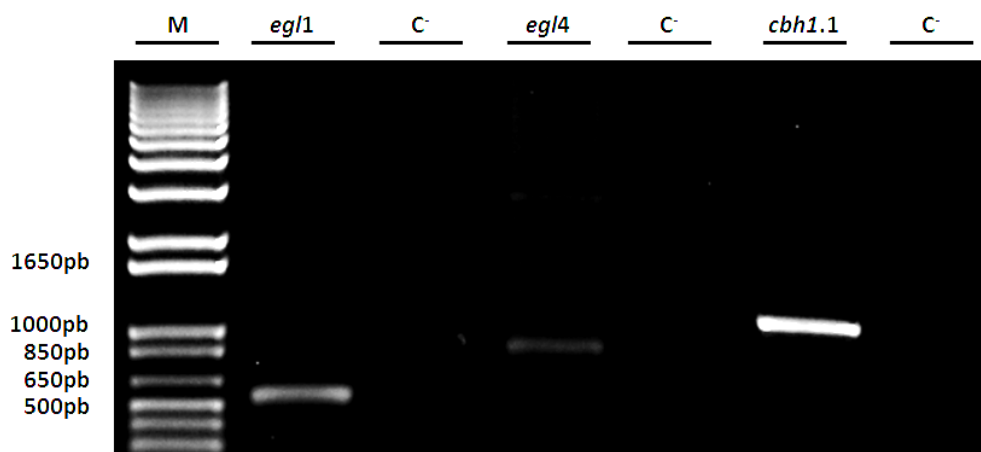
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Amplificação das regiões 5' UP dos genes de celulase de *Hgvt*

As regiões promotoras dos genes de celulase de *Hgvt* foram obtidas por PCR a partir do DNA genômico do fungo e os fragmentos analisados por eletroforese em gel de agarose.

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação da região promotora dos genes *egl1* e *egl4* foram desenhados a partir das sequências descritas por Takashima e colaboradores (1996; 1999). As sequências 5'UP dos genes obtidas apresentaram tamanhos esperados de 545 e 850 pares de base, respectivamente (**Fig. 8**).

O gene *cbh1.1* foi clonado e caracterizado por Azevedo e colaboradores (1990). A região promotora conhecida desse gene é de 1618pb. Por se tratar de um fragmento grande, o que dificultaria as clonagens no vetor repórter, optamos por amplificar a região correspondente aos 1059pb imediatamente anteriores ao ATG.



**Figura 8.** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/ml, da amplificação por PCR das regiões 5'UP dos genes *egl1*, *egl4* e *cbh1.1* de *Hgvt*. As sequências promotoras de *egl1*, *egl4* e *cbh1.1* apresentaram o tamanho esperado de 545pb, 850pb e 1.059pb, respectivamente. Os controles negativos de cada reação (sem DNA) estão representados por C<sup>-</sup> e o marcador 1kb plus DNA Ladder por M.

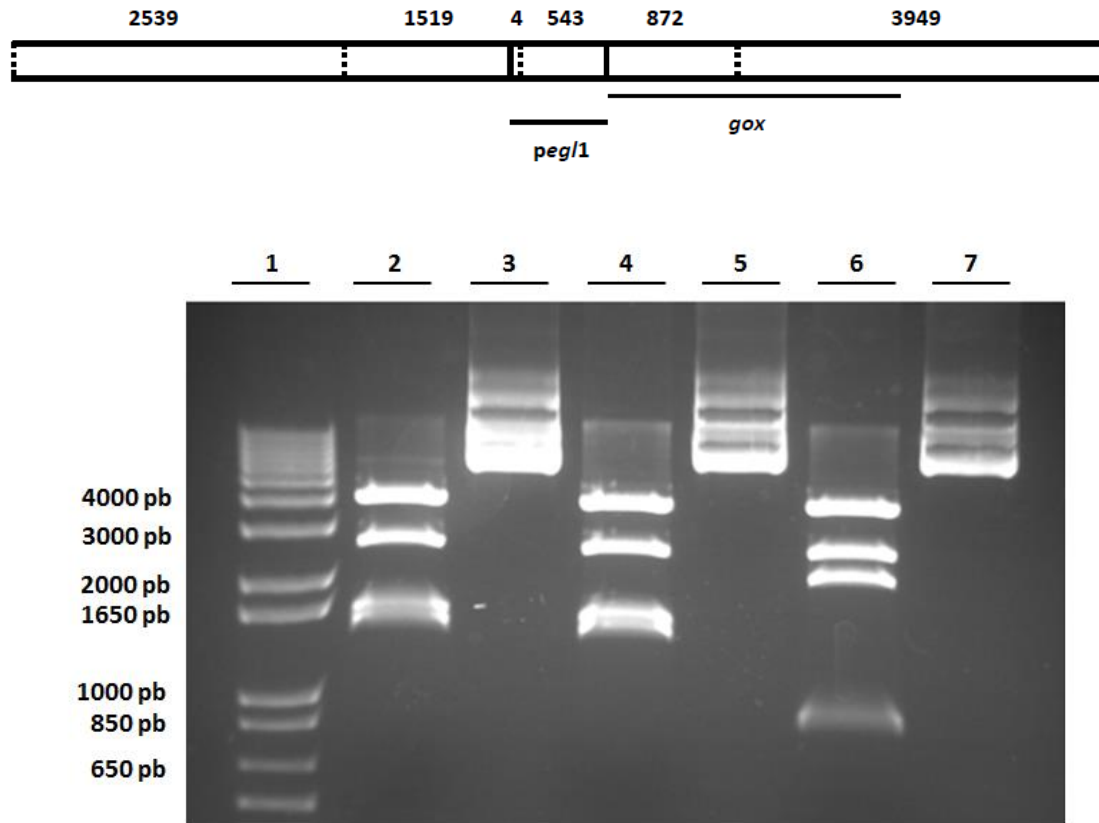
## 6.2 Clonagem das regiões 5'UP no vetor repórter pGOX

Genes repórter são aqueles cujos produtos podem ser rapidamente detectados utilizando-se metodologias simples (revisado por Cui *et al.*, 1994). Essa ferramenta é amplamente empregada no estudo de expressão de genes e envolve a utilização de sequências reguladoras dos genes em estudo para o controle da transcrição do gene repórter. A expressão desse gene passa a depender da ação exercida pela região regulatória (Naylor, 1999).

O vetor de expressão pGOX foi construído previamente por nosso grupo de pesquisa utilizando-se o gene *goxA* de *A.niger* como repórter. Este gene codifica a proteína glicose oxidase que catalisa a oxidação de D-glicose em gliconolactona e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Essa enzima é produzida naturalmente por algumas espécies de fungo e insetos e atua como agente antibacteriano e antifúngico por meio da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (revisado por Wong *et al.*, 2008). Na indústria é utilizada em diversos processos e na clínica e empregada na detecção e quantificação de glicose em soluções e fluidos corporais (Luque *et al.*, 2004).

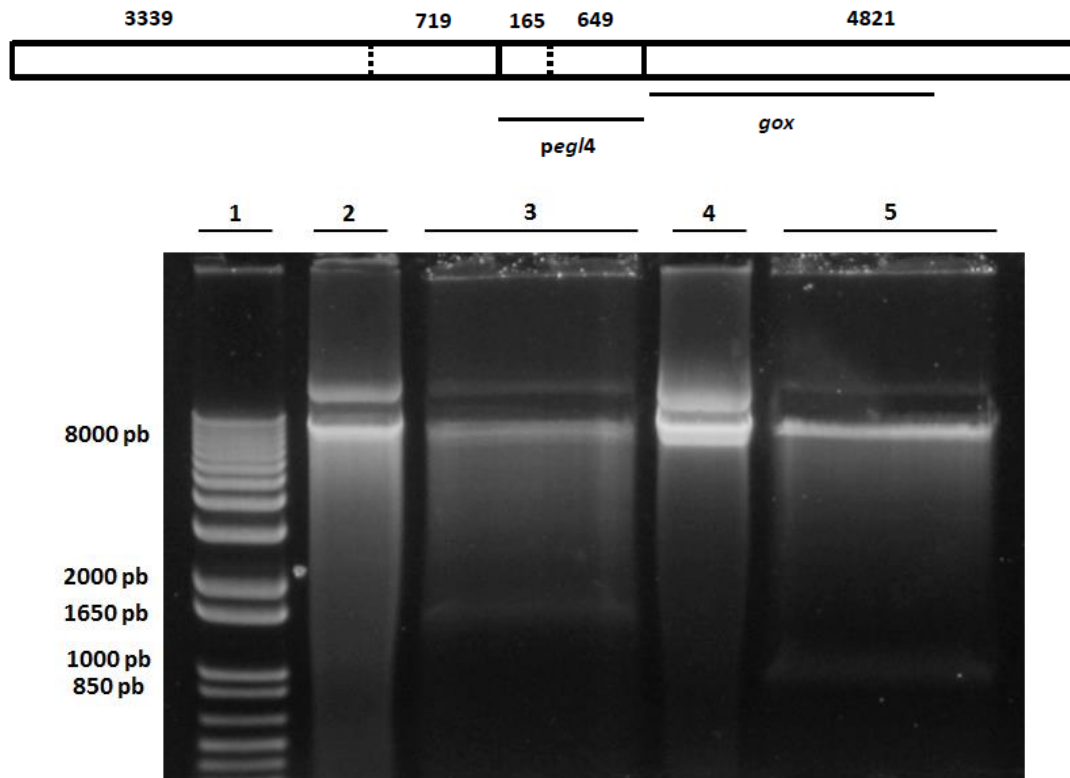
As regiões 5'UP dos genes *egl1*, *egl4* e *cbh1.1* foram inseridas com sucesso no vetor pGOX. Em virtude da presença de sítio único de clonagem, em *Xba*I, os promotores poderiam ser introduzidos em duas orientações em relação ao gene repórter. A clonagem correta dos insertos dentro do plasmídeo foi confirmada utilizando-se o perfil de restrição dos vetores recombinantes.

Para o sistema gene repórter pGOX::*egl1* foi utilizada a enzima *Eco*R I. O perfil de restrição foi analisado por eletroforese em gel de agarose. Os vetores com o inserto na orientação correta apresentariam fragmentos de aproximadamente 4.0, 2.5, 1.5 e 1.4kb como pode ser deduzido a partir da figura 9A. Os plasmídeos 1 e 2 apresentaram este padrão, diferentemente do observado para o plasmídeo 3, no qual a orientação da região promotora está invertida (fragmentos de cerca de 4.0, 2.5, 2.0 e 0.87 kb) (**Fig. 9B**).



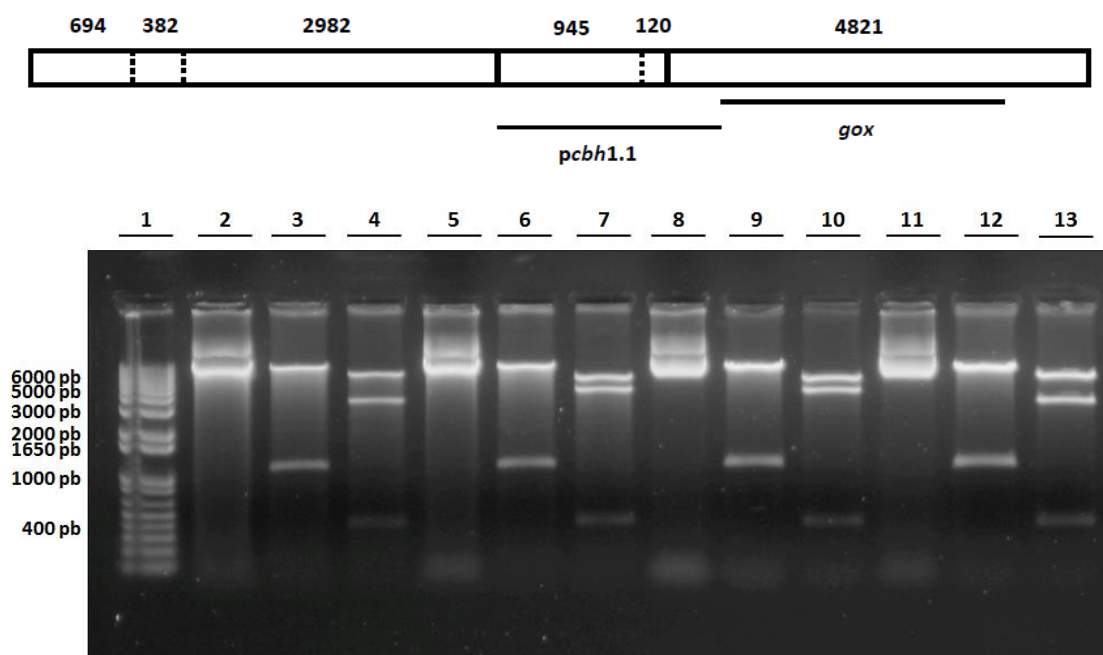
**Figura 9.** A) Representação esquemática do vetor pGOX contendo o promotor de *egl1* (*peg1*) na orientação correta. Os números referem-se aos tamanhos dos fragmentos em pares de base. As linhas tracejadas representam sítios de restrição para *EcoR* I. B) Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5µg/ml da digestão do vetor recombinante pGOX::*egl1* com a enzima *EcoR* I. Poço 1: marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Poço 2: plasmídeo recombinante 1 digerido (inserto na orientação correta). Poço 3: plasmídeo recombinante 1 intacto. Poço 4: plasmídeo recombinante 2 digerido (inserto na orientação correta). Poço 5: plasmídeo recombinante 2 intacto. Poço 6: plasmídeo recombinante 3 digerido (inserto na orientação invertida). Poço 7: plasmídeo recombinante intacto.

A construção pGOX::*egl4* foi confirmada pela digestão com a enzima *Bam*H I (**Fig. 10**). Tal digestão resulta em fragmentos de 8809pb e 884pb para a orientação correta e 8325pb e 1368pb para a orientação invertida.



**Figura 10.** A) Representação esquemática do vetor pGOX contendo o promotor de *egl4* (*peg/4*) na orientação correta. Os números referem-se aos tamanhos dos fragmentos em pares de base. As linhas tracejadas correspondem a sítios de restrição para *BamH* I. B) Análise eletroforética em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL, da digestão do vetor recombinante pGOX::*egl4* com a enzima *BamH* I. Poço 1: marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Poço 2: plasmídeo recombinante 1 intacto. Poço 3: plasmídeo recombinante 1 digerido (orientação invertida). Poço 4: plasmídeo recombinante 2 intacto. Poço 5: plasmídeo recombinante 2 digerido (orientação correta).

A figura 11 apresenta a clonagem da região 5'UP do gene *cbh1.1* no sistema gene repórter (pGOX::*cbh1.1*). A confirmação da clonagem foi realizada utilizando-se a enzima *Xho* I. Os plasmídeos 2 e 3 apresentam a região promotora clonada na orientação correta (fragmentos de aproximadamente 5.6kb, 3.9kb e 382pb). A digestão de vetores contendo o promotor em orientação invertida resulta em fragmentos de 6.4kb, 3.1kb e 382pb (plasmídeos 1 e 5).



**Figura 11.** A) Representação esquemática do vetor pGOX contendo o promotor de *cbh1.1* (*pcbh1.1*) na orientação correta. Os números referem-se aos tamanhos dos fragmentos em pares de base. As linhas tracejadas correspondem a sítios de restrição para *Xho* I. B) Análise eletroforética em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/ml, da digestão de pGOX::*egl1* com as enzimas *Xba* I e *Xho* I. Poço 1: marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Poços 2, 3 e 4: plasmídeo recombinante 1 intacto, digerido com *Xba* I, e com *Xho* I, respectivamente. Poços 5, 6 e 7: plasmídeo recombinante 2 intacto, digerido com *Xba* I, e com *Xho* I, respectivamente. Poços 8, 9 e 10: plasmídeo recombinante 3 intacto, digerido com *Xba* I, e com *Xho* I, respectivamente. Poços 11, 12 e 13: plasmídeo recombinante 5 intacto, digerido com *Xba* I, e com *Xho* I, respectivamente. Os plasmídeos recombinantes 2 e 3 apresentam a sequência promotora na orientação correta com relação ao gene repórter.

A atividade do promotor, na regulação do gene *gox* pode ser analisada de forma quantitativa por meio da atividade de glicose oxidase liberada no sobrenadante de cultivo dos fungos recombinantes (Mach *et al.*, 1999). Para esse ensaio utiliza-se o reagente 10-acetil-3,7- dihidroxifenoxazina (Amplex® Red Glucose/Glucose Oxidase Assay da Invitrogen), um substrato incolor e estável para a enzima peroxidase, também fornecida no kit. A glicose oxidase reage com D-glicose formando D-gliconolactona e peróxido de hidrogênio. Na presença da peroxidase, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage com o reagente Red gerando um produto fluorescente que pode ser analisado por espectrofotometria (571 a 585nm).

Utilizando o gene repórter *gox*, Mach e colaboradores (1999) observaram padrões distintos para a expressão dos genes de quitinase *ech42* e *nag1* de *T.atroviride*, em resposta a diferentes fontes de carbono. A expressão do gene *nag1* foi induzida em presença de quitoooligossacarídeos e produtos derivados do seu catabolismo, enquanto que a expressão do gene *ech42* parece não ser induzida diretamente por quitina ou quitoooligosacarídeos, mas pela depleção de carbono no meio e por condições de stress do organismo.

Würleitner e colaboradores (2003) utilizaram versões mutadas do promotor de *xyn2* de *T.reesei* fusionadas ao gene *goxA* de *A.niger* e verificaram que a eliminação e mutação dos elementos em *cis* AGAA-box e CCAAT-box, respectivamente, resultaram no aumento da transcrição basal e também induzida desse gene, enquanto que a eliminação de sítios de ligação para o fator transcricional Ace2 impediu completamente a transcrição de *xyn2*. Utilizando esta mesma metodologia, Rauscher e colaboradores (2006) analisaram a expressão do gene *xyn1* também de *T. reesei* e evidenciaram a possível atuação de fatores transcricionais, Xyr1 e Ace 1 na regulação de desse gene.

Os dados acima indicam que o gene repórter *gox* poderá fornecer importantes informações a respeito da atividade dos promotores uma vez tenhamos as linhagens de *A. nidulans* recombinantes contendo as construções moleculares obtidas no presente trabalho. Poderemos assim, determinar as melhores condições de indução dos genes de nosso interesse alterando condições do meio de cultura tais como fontes de carbono e pH. No presente momento estamos padronizando os protocolos de transformação de *A. nidulans* por fusão de protoplastos (Tilburn *et al.*, 1983) e por biobalística (Fungaro *et al.*, 1995) com nossas construções moleculares uma vez que não estão disponíveis protocolos de transformação genética eficientes para *Hgvt*.

### **6.3 Produção e purificação dos domínios de ligação ao DNA dos fatores de transcrição CreA e PacC**

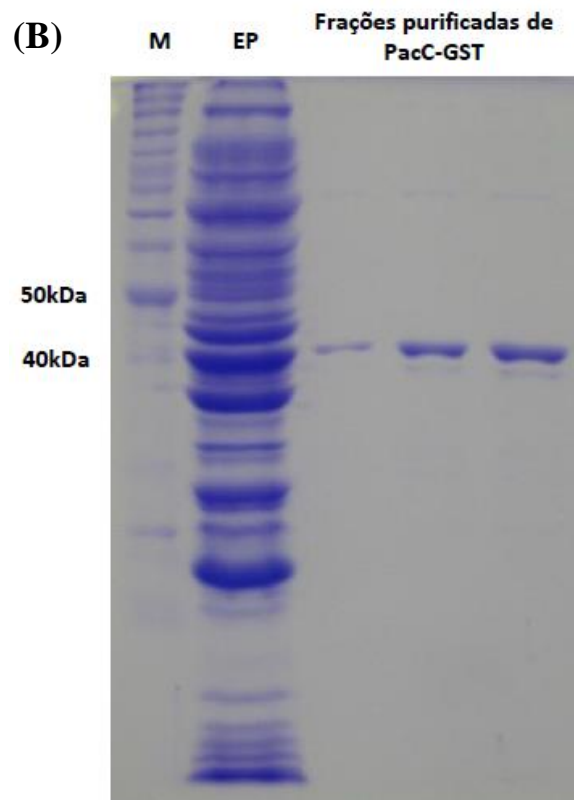
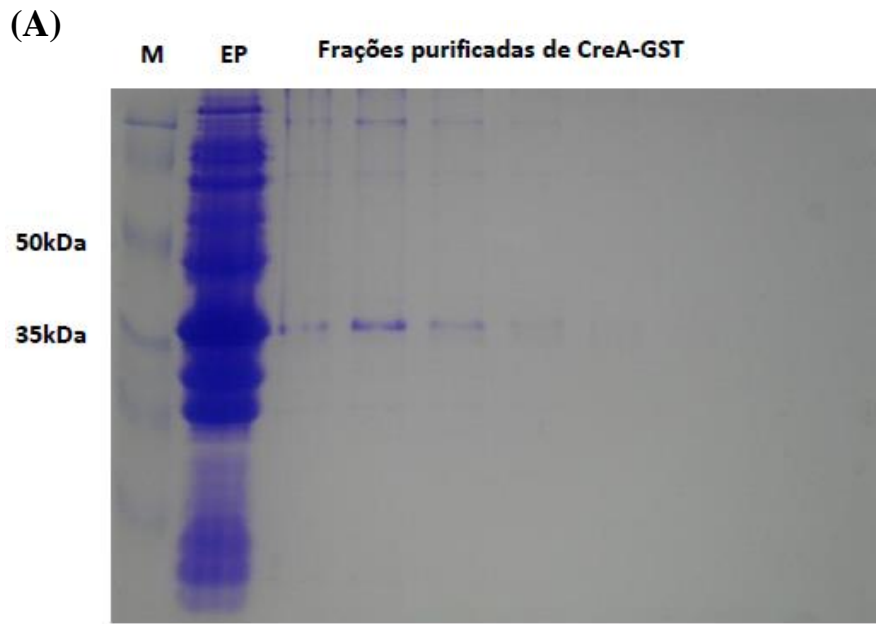
Os fatores transcricionais CreA/Cre1 e PacC desempenham um papel importante na regulação da expressão de diferentes genes de fungos filamentosos. Essas proteínas reconhecem sequências específicas presentes nas regiões promotoras, promovendo a repressão ou a ativação da transcrição gênica (Margolles-Clark *et al.*, 1997; Kumar & Ramón, 1996).

O gene PacC de *H. grisea* foi clonado e caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa. O gene codifica um polipeptídeo predito de 639 resíduos de aminoácidos, que geraria uma proteína de 67,5kDa, com grande similaridade a homólogos de PacC de outros organismos como *Magnaporthe grisea* (73,8%), *Neurospora crassa* (72%) e *A. nidulans* (60,1%) (Aguiar, 2006; Poças-Fonseca *et al.*, 2008). O domínio de ligação ao DNA de PacC em *Hgvt* apresenta 92,1% de similaridade com o homólogo de *A.nidulans*. A proteína CreA, com aproximadamente 45.8kDa, apresenta a região dedo de zinco com grande similaridade a homólogos em *T.reesei* (94.6%) e *A. niger* (89.3%) (Takashima *et al.*, 1998). Esses dados sugerem que esses fatores de transcrição desempenhem funções semelhantes nos diferentes microrganismos.

Para analisar a possível interação desses fatores com as sequências específicas identificadas nas regiões promotoras de genes de celulases de *Hgvt*, os domínios de ligação das proteínas foram produzidos em *E.coli* como proteínas de fusão à glutathione-S-transferase (GST) para posterior ensaio *in vitro* de ligação ao DNA.

Os domínios de ligação das proteínas CreA e PacC recombinantes foram purificados em colunas GST-Sepharose e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. As proteínas recombinantes CreA-GST e PacC-GST apresentaram tamanho esperado de 35kDa e 40,8kDa, respectivamente (**Fig. 12**).





**Figura 12.** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue das proteínas recombinantes CreA-GST (A) e PacC-GST (B). Extrato protéico total (EP) e frações de cromatografia em GST-Sepharose das proteínas recombinantes CreA-GST (35kDa) e PacC-GST (40, 8kDa). M: Marcador Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) no gel A e BenchMark Protein Ladder (Invitrogen) no gel B.

## 6.4 Ensaios de retardo de mobilidade eletroforética

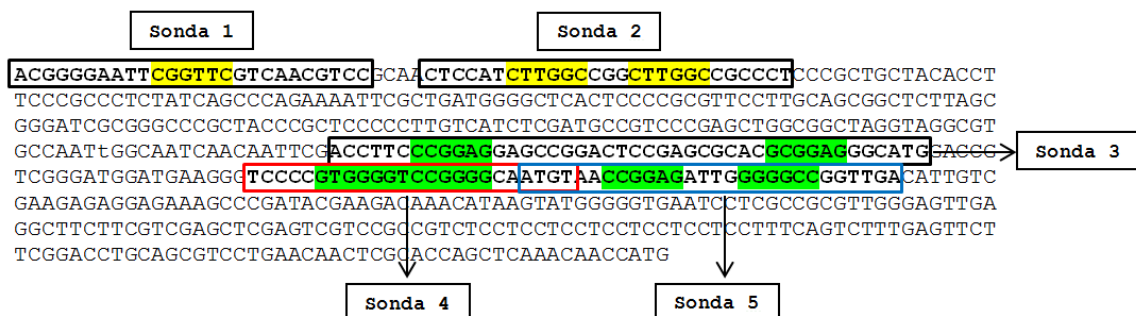
A partir da região promotora dos genes de *egl1* e *egl4*, buscou-se *in silico* as sequências 5'-SYGGRG-3' (Cubero & Scazzocchio, 1994) e 5'-GCCA(A/G)G-3' (Espeso *et al.*, 1997), reconhecidas pelos fatores de transcrição CreA e PacC, respectivamente. Foram localizadas sequências com todas as combinações possíveis nas duas direções e em ambas as fitas de DNA.

As sequências obtidas contendo os sítios de reconhecimento das proteínas PacC e CreA foram utilizadas como molde para a síntese de sondas as quais foram marcadas com fluorescência.

## 6.5 Região promotora de *egl1*

A figura 13 apresenta os 549 pares base referentes à região promotora do gene *egl1* e as sequências correspondentes às sondas contendo os sítios de reconhecimento para PacC (quatro sítios) e CreA (nove sítios). Entretanto, nem todos os sítios foram utilizados como molde para a síntese de sondas.

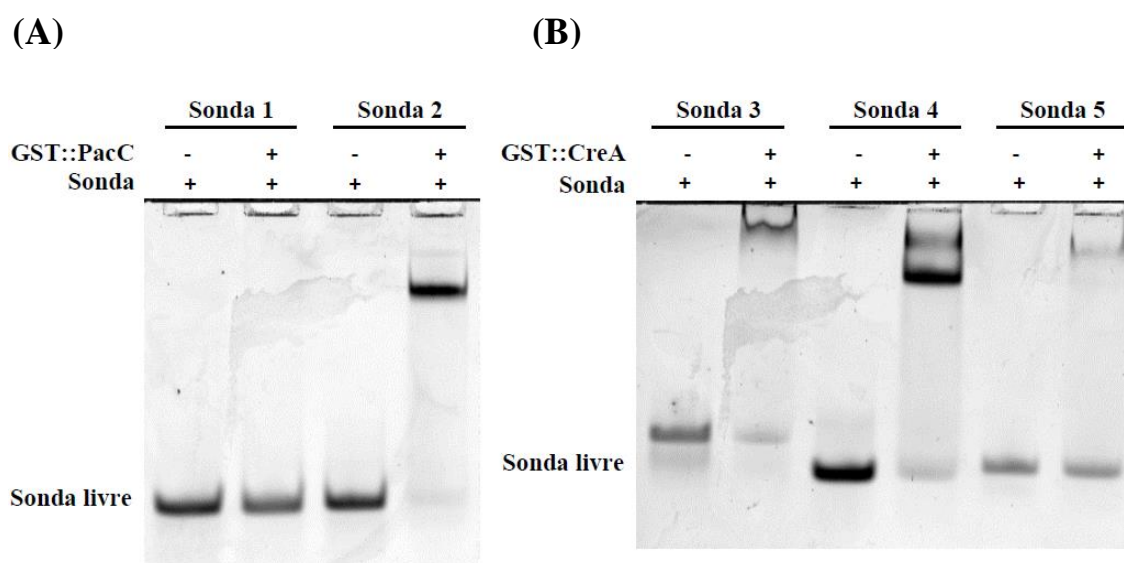
Ao todo cinco sondas foram sintetizadas. As sondas 1 e 2 apresentam respectivamente um e dois sítios de ligação a PacC. As sondas 3 e 5 contem dois sítios para CreA e a sonda 4, três sítios sobrepostos para esse mesmo fator de transcrição (Fig. 13).



**Figura 13.** Região promotora de *egl1* de *Hgvt*. Os sítios para PacC apresentam-se em amarelo e para CreA, em verde.

Com relação aos possíveis sítios de interação para PacC (**Fig.14A**), não se observou a formação de complexo DNA-proteína para a sonda *egl1-1*, que apresenta um único sítio predito. Já para a sonda 2, um nítido *shift* foi detectado. Ao compararmos as duas sondas, observamos, além da diferença no número de sítios preditos, que o motivo consenso para ligação encontra-se invertido entre elas. Nesse sentido, especulamos se o domínio de ligação ao DNA de PacC seria capaz de interagir apenas com a sequência 5'- CTTGGC-3' e não com 5'- CGGTTC-3'.

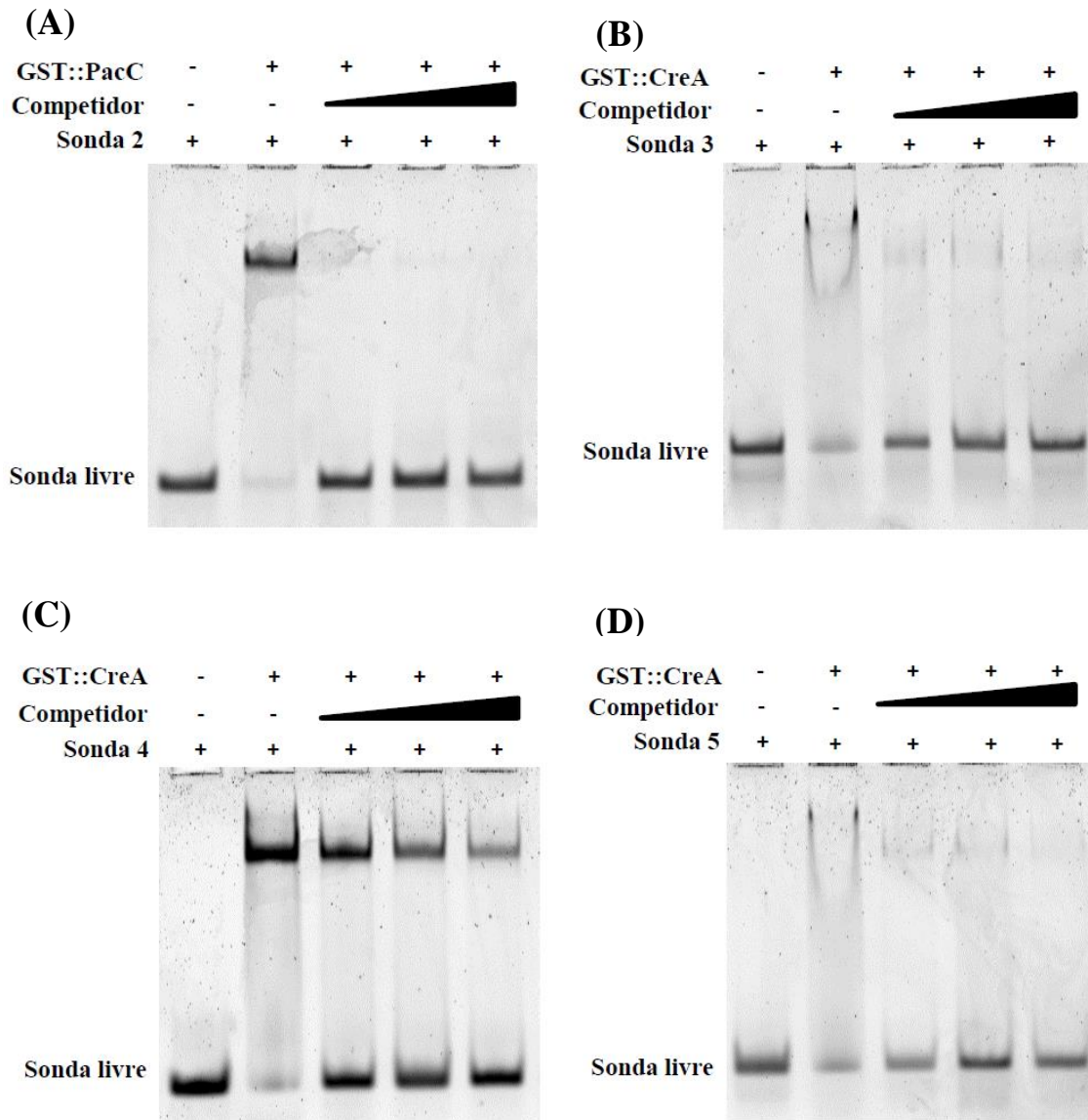
A formação de complexos DNA proteína também foi observada nos sítios para CreA nas sondas 3, 4 e 5 (**Fig.14**).



**Figura 14.** Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética para avaliar a interação entre as sondas de *egl1* e os domínios de ligação ao DNA das proteínas PacC e CreA. Gel A: Sondas 1 e 2 incubadas com GST::PacC. Gel B: Sondas 3, 4 e 5 incubadas com GST::CreA.

Com o objetivo de verificar se essas ligações estão ocorrendo de forma específica para as duas proteínas, realizou-se o ensaio de competição na qual as sondas não marcadas apresentam-se em concentrações molares 25, 50 e 100X mais elevadas do que as sondas marcadas.

No primeiro ensaio, foram utilizados competidores específicos, com a mesma sequência nucleotídica, porém não marcados com o fluoróforo. Para todas as sondas, o sinal da fluorescência diminuiu à medida que a concentração do competidor foi aumentada (**Fig. 15**).

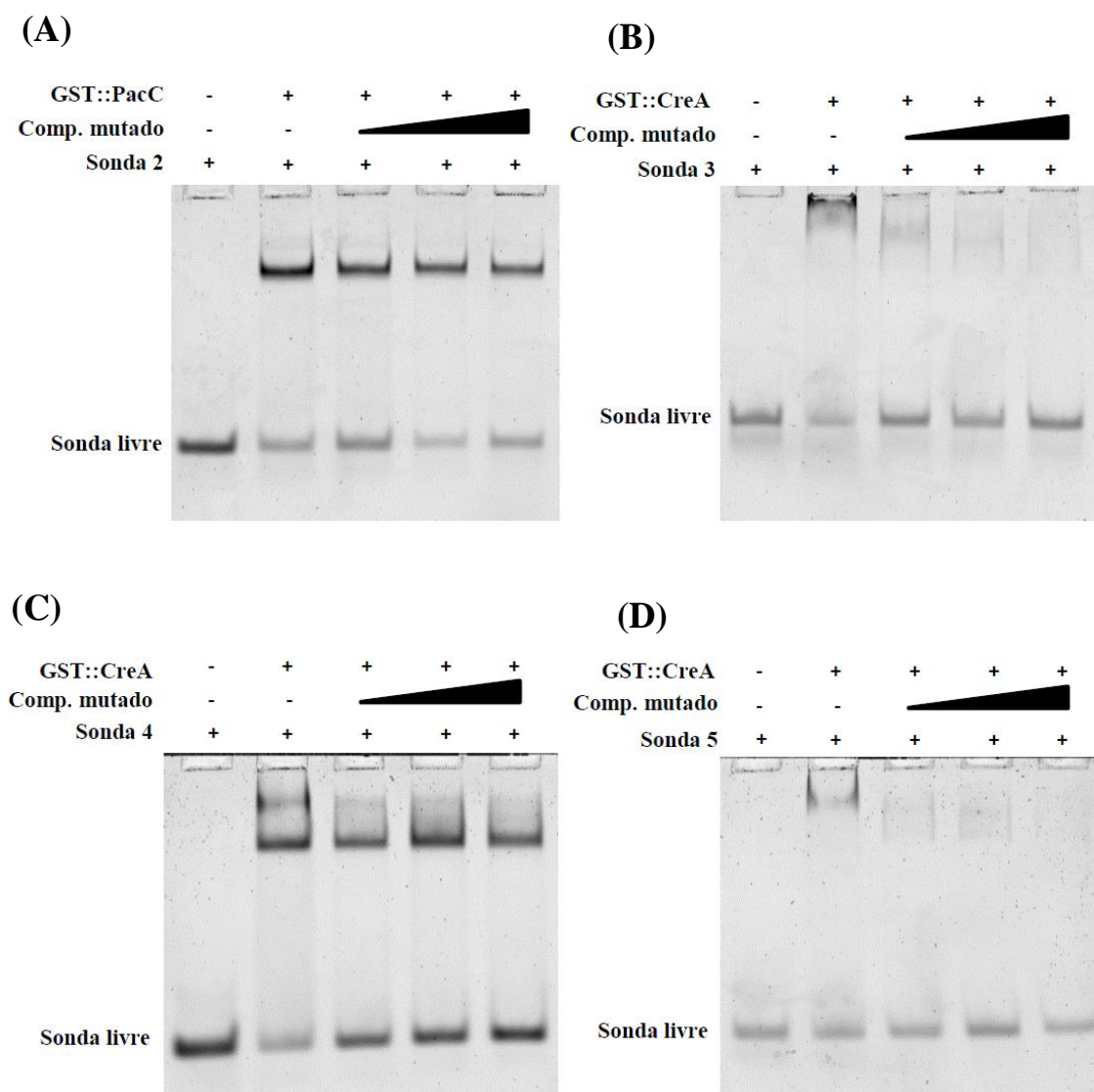


**Figura 15.** Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética utilizando competidores específicos para as sondas de *egl1*. Gel A: sonda 2 incubada com GST::PacC e competidores específicos em concentrações crescentes (25, 50 e 100X). Géis B, C e D: sondas 3, 4 e 5 incubadas com GST::CreA e competidores específicos em concentrações crescentes (25, 50 e 100X). O sinal da fluorescência diminuiu à medida que a concentração do competidor foi aumentada em todos os ensaios sugerindo uma possível interação específica entre sonda e proteína.

Esse resultado sugere que as interações detectadas sejam específicas entre os fatores transcricionais e os sítios de ligação preditos. Entretanto, a confirmação desse dado só é possível por meio da utilização de sondas mutadas. No segundo ensaio, portanto, foram utilizadas sondas com os sítios de ligação aos fatores transcricionais alterados. Sabe-se que o segundo G e o quarto A na sequência consenso de PacC (5'-

GCCA(A/G)G-3') são fundamentais para a ligação entre DNA-proteína (Espeso *et al.*, 1997). Por esse motivo, essas bases foram substituídas por uma timina nas sondas mutadas. Com relação à sequência de ligação para CreA, o terceiro e o quarto G do consenso 5'-SYGGRG-3' foram substituídos por uma adenina (Cubero & Scazzocchio, 1994).

Somente as sondas 2 e 4 mostraram se ligar às proteínas de maneira específica, uma vez que as sondas contendo mutações não competiram pela interação. As sondas 3 e 5 se ligaram de forma inespecífica à proteína (**Fig. 16**).

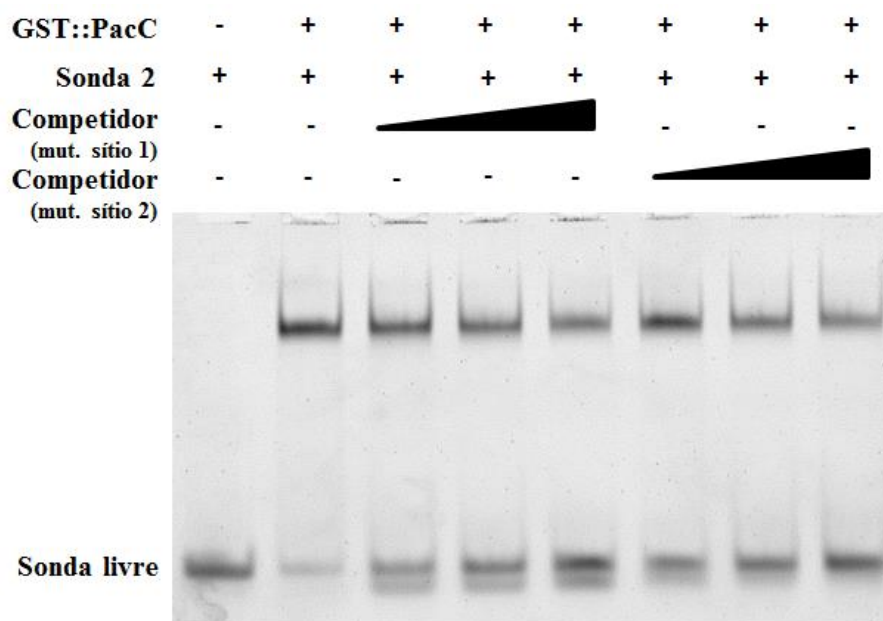


**Figura 16.** Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética utilizando competidores mutados para as sondas de *egl1*. As mutações nos sítios de ligação para PacC foram realizadas inserindo-se uma timina na posição ocupada pela segunda citosina e pela quarta adenina no motivo 5'-GCCARG-3' (Espeso *et al.*, 1997). Para mutações nos sítios de ligação para CreA uma adenina foi inserida na terceira e quarta posição em substituição às guaninas presentes no motivo 5'-SYGGRG-3' (Cubero & Scazzocchio, 1994).

Gel A: sonda 2 incubada com GST::PacC e concentrações crescentes de competidores mutados (25, 50 e 100X). Géis B, C e D: sondas 3, 4 e 5 incubadas com GST::CreA e competidores mutados em concentrações crescentes (25, 50 e 100X). A perda de sinal fluorescente indica uma interação inespecífica entre DNA e proteína enquanto que a permanência do sinal demonstra a especificidade da ligação.

Considerando que a sonda 2 apresenta dois possíveis sítios de ligação para PacC e que a sonda 4 apresenta três possíveis sítios de ligação para CreA, foram utilizados competidores com mutações diferenciadas a fim de verificar em qual dos dois sítios possíveis está ocorrendo de fato a interação.

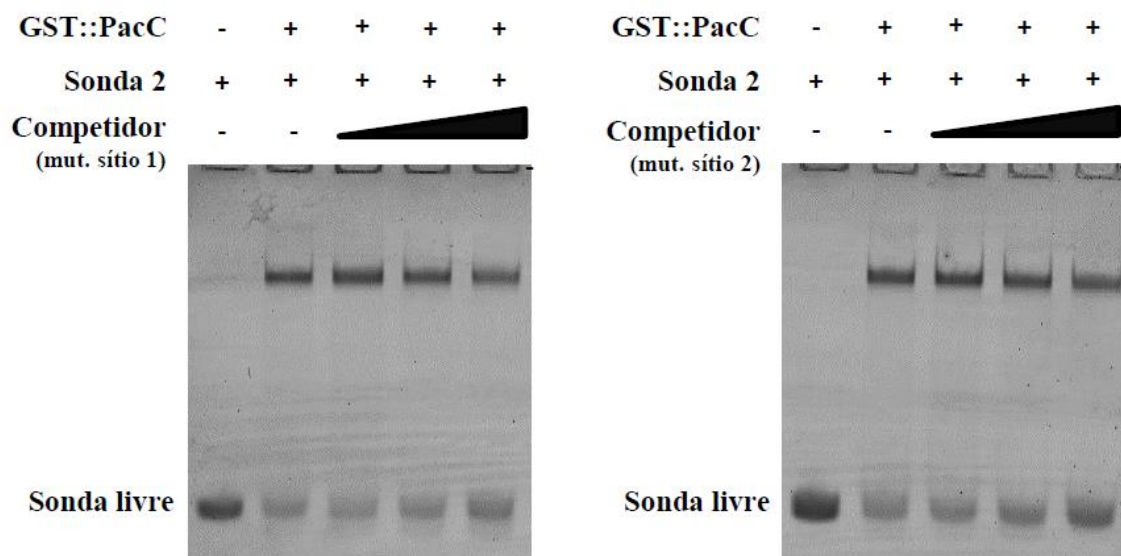
Em relação a sonda 2, quando foram feitas mutações apenas no sítio 1 ou apenas no sítio 2 se verificou que concentrações molares crescentes desses competidores provocaram apenas uma sutil diminuição do sinal fluorescente (**Fig. 17**), o que não nos permitiu comprovar efetivamente se as sequências mutadas estavam de fato competindo pela ligação a proteína. A presença de quantidade excessiva de competidores na reação pode estar comprometendo a interpretação do resultado.



**Figura 17.** EMSA utilizando a sonda 2 de *egl1* e competidores com mutação em apenas um dos dois sítios para PacC em concentrações molares de 25, 50 e 100 vezes maiores do que a primeira. As mutações nos sítios de ligação para PacC foram realizadas inserindo-se uma timina na posição ocupada pela segunda citosina e pela quarta adenina no motivo 5'-GCCARG-3' (Espeso *et al.*, 1997).



Em razão disso, repetiu-se o experimento com concentrações molares inferiores de competidores mutados (**Fig. 18**). Como nesse último experimento não se observou diminuição da intensidade de fluorescência do sinal, concluímos que essas interações são específicas uma vez que mutações nos sítios de ligação impossibilitam a ligação da proteína.



**Figura 18.** EMSA utilizando a sonda 2 de *egl1* e competidores com mutação em apenas um dos dois sítios para PacC em concentrações molares de 5, 20 e 50 vezes maiores do que a primeira. As mutações nos sítios de ligação para PacC foram realizadas inserindo-se uma timina na posição ocupada pela segunda citosina e pela quarta adenina no motivo 5'-GCCARG-3' (Espeso *et al.*, 1997). A permanência do sinal fluorescente evidencia a interação específica entre PacC e os dois sítios de ligação para esta proteína presente na região promotora de *egl1*.

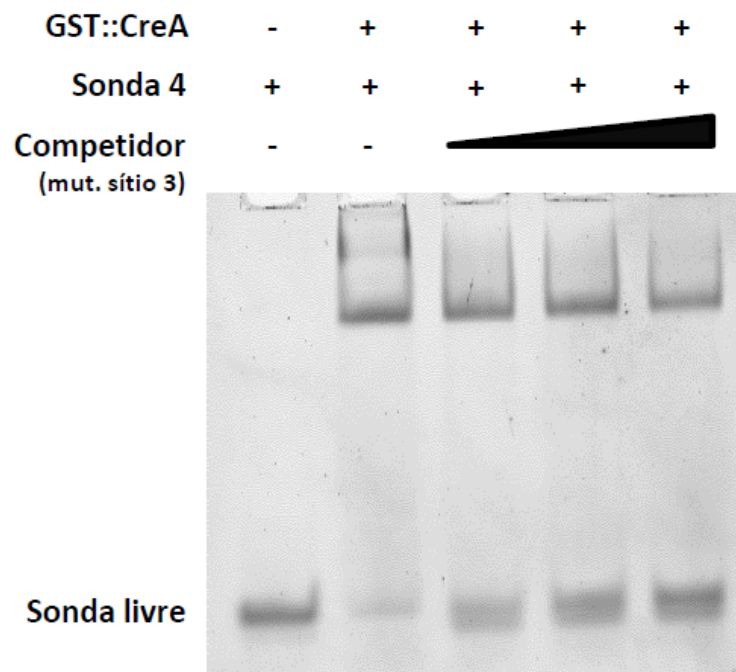
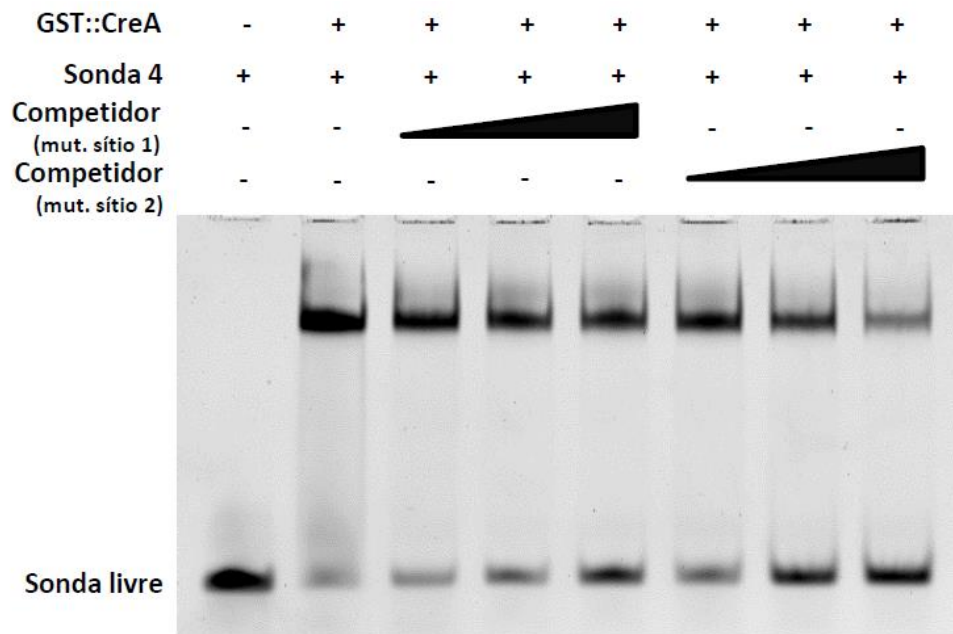
Uma alternativa para a utilização de concentrações menores de competidores mutados seria a utilização de sondas mutadas marcadas com fluoresceína. Tal abordagem poderia aportar um resultado de interpretação mais direta. No entanto, tal abordagem seria extremamente dispendiosa dado ao elevado custo de síntese de oligonucleotídeos marcados.

A detecção de interações específicas entre PacC-GST e o promotor do gene *egl1* associada ao aumento de expressão desse gene que Mello-de-Sousa e colaboradores (2011) relataram quando do crescimento de *Hgv1* em condições alcalinas, nos permite

concluir que o fator de transcrição PacC realmente está envolvido na regulação da expressão gênica de *egl1*.

A figura 19 apresenta o experimento de competição com sonda mutada individualmente em cada um dos três sítios possíveis para a interação de CreA presentes na sonda 4. Observa-se que para os sítios 1 e 3 não existe alteração da intensidade do sinal indicando interação específica. Por outro lado, para o sítio 2, observa-se claramente que a versão mutada da sonda, em concentrações molares crescentes, foi capaz de interagir com a proteína recombinante, levando a uma diminuição da intensidade do sinal fluorescente.



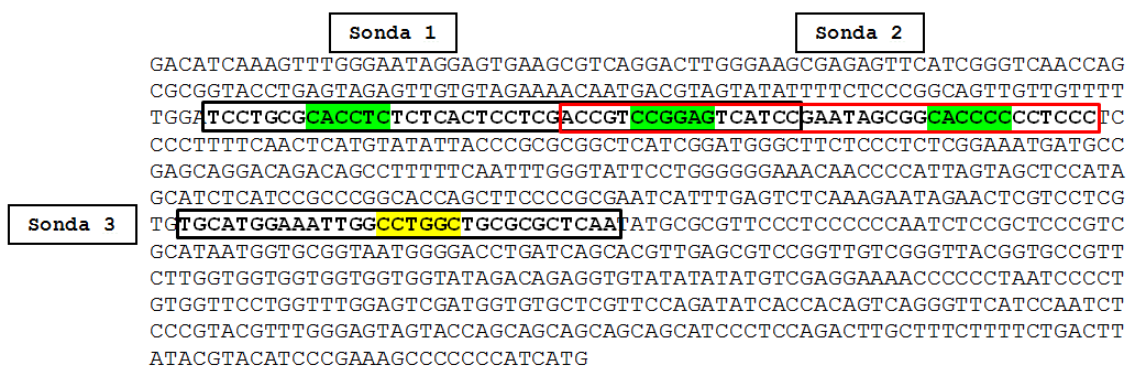


**Figura 19.** EMSA utilizando a sonda 4 de *egl1* e competidores com mutação em apenas um dos dois sítios para CreA em concentrações molares de 25, 50 e 100 vezes maiores do que a primeira. As mutações nos sítios de ligação para CreA foram realizadas inserindo-se uma adenina na terceira e quarta posição em substituição às guaninas presentes no motivo 5'-SYGGRG-3' (Cubero & Scazzocchio, 1994). A perda de sinal fluorescente no sítio 2 indica uma interação inespecífica entre DNA e proteína enquanto que a permanência do sinal nos sítios 1 e 3 demonstram a especificidade das ligações.

No presente trabalho, encontramos nove variações para o consenso 5' SYGGRG- 3' de ligação para CreA no promotor de *egl1*. Takashima e colaboradores (1998) descreveram a presença de apenas cinco sítios, pois não consideraram algumas sequências invertidas. Esses autores também detectaram interações DNA-proteína, e por DNA *footprinting*, demonstraram uma forte interação com a região referente a nossa sonda 4. Desse modo, a especificidade da interação do fator transcricional CreA com o promotor do gene *egl1* foi comprovada por duas abordagens experimentais diferentes: o emprego de sondas mutadas (esse trabalho) e DNA *footprinting* (Takashima *et al.*, 1998). Estudos anteriores do nosso grupo Mello-de-Sousa e colaboradores (2011) indicaram que o acúmulo de transcritos de *egl1* é menor quando o fungo é crescido em glicose em comparação ao crescimento em bagaço de cana-de-açúcar. Tomados em conjunto esses dados indicam que o mecanismo de repressão por glicose em *egl1* envolve o fator transcricional CreA.

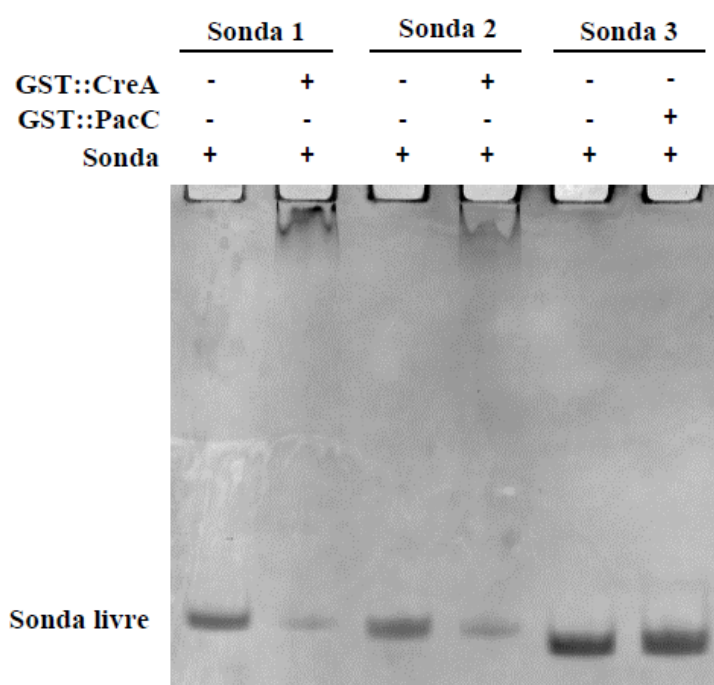
## 6.6 Região promotora de *egl4*

Na sequência de aproximadamente 800 pares de base da região promotora de *egl4* foi localizado apenas um sítio para PacC e oito sítios de reconhecimento para CreA. Para a análise estrutural desse promotor foram desenhadas três sondas, duas delas contendo dois sítios de reconhecimento para CreA cada e uma representando o sítio de ligação para PacC (**Fig. 20**).



**Figura 20.** Região promotora de *egl4* de *H. grisea*. O sítio para PacC apresentam-se em amarelo e para CreA, em verde.

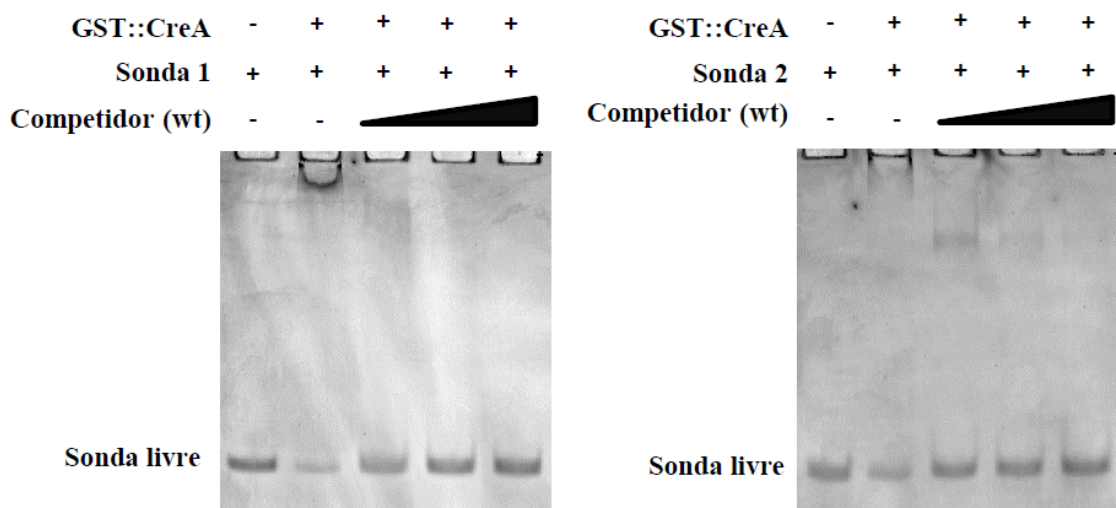
Os EMSA apresentados na Figura 21 demonstraram que houve interação apenas com CreA (sondas 1 e 2) mas não com PacC (sonda 3). O sítio único de PacC encontrado na região 5'UP de *egl4* apresenta a sequência 5'-CCTGGC-3', que também não foi reconhecida pela proteína PacC recombinante em experimentos com a região promotora do gene *creA* de *Hgvt* (Mello-de-Sousa *et al.*, 2011). Análises por EMSA da região promotora do gene *chs4* de *P. brasiliensis* mostraram que uma sonda contendo uma guanina (ao invés de uma adenina) na quinta posição não foi capaz de interagir como o homólogo de PacC desse mesmo organismo (Moraes, 2009). Acreditamos assim que, em *Hgvt*, seja necessária a presença de uma adenina, ao invés de uma guanina, na quinta posição para que ocorra a ligação do fator transcricional PacC.



**Figura 21.** Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética para avaliar a interação entre o promotor de *egl4* e os domínios de ligação ao DNA das proteínas CreA e PacC.

A especificidade de ligação foi analisada por ensaios de competição utilizando competidores específicos e competidores mutados conforme descrito anteriormente. As sondas 1 e 2, quando incubadas com os respectivos competidores específicos apresentaram perda de sinal fluorescente no gel (**Fig. 22**) o mesmo observado quando utilizados competidores mutados (dados não mostrados), demonstrando que a sonda mutada não marcada em concentrações maiores competiu com a sonda marcada, ou seja, a interação é inespecífica.

Outros sítios de ligação para CreA estão presentes no promotor do gene *egl4*. Entretanto, estes estão dispostos isoladamente ao longo do promotor. Tais sítios não foram avaliados, pois evidências sugerem a necessidade de dois sítios contínuos para a ocorrência de ligação (Cubero & Scazzocchio, 1994; Mach *et al.*, 1996). O mesmo se aplica ao promotor do gene *egl1* previamente discutido.



**Figura 22.** Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética utilizando competidores específicos para as sondas de *egl4*. Gel A: sonda 1 incubada com GST::CreA e concentrações crescentes de competidores (25, 50 e 100X). Gel B: sondas 2 incubada com GST::CreA e competidores específicos em concentrações crescentes.

Nossos dados, então sugerem que CreA e PacC não estão envolvidos na regulação da expressão de *egl4*. Explicamos assim os resultados encontrados por Mello-de-Sousa e colaboradores (2011) que relataram que houve maior acúmulo de transcritos *egl4* em pH ácido e que não houve diferença significativa no acúmulo de transcritos quanto à única fonte de carbono utilizada (glicose ou bagaço de cana-de-açúcar).

A expressão distinta de genes de celulase de *Hgvt* em função da fonte de carbono foi primeiramente descrita por Poças-Fonseca e colaboradores (2000) que analisaram por RT-PCR a expressão dos genes de celobiohidrolases *cbh1.1* e *cbh1.2*. A transcrição do primeiro foi induzida em presença de bagaço de cana-de-açúcar, lactose (0,1%) e celobiose (0,1%) e reprimida em presença de glicose (0,1% ou 1%). Por outro lado, o gene *cbh1.2* foi expresso em todas as condições, inclusive em presença de

glicose. Na região promotora de *cbh1.2* foram localizados possíveis sítios envolvidos na repressão por carbono (Poças-Fonseca *et al.*, 1997). Entretanto, a funcionalidade destes ainda não foi avaliada. Também é de interesse do nosso grupo de pesquisa a caracterização dos promotores de genes de celobiohidrolases a fim de compreender o mecanismo de regulação de genes codificadores de diferentes classes de celulase desse fungo.

**CONCLUSÃO E  
PERSPECTIVAS**

---

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram obtidas construções moleculares utilizando as sequências dos genes *egl1*, *egl4* e *cbh1* de *Hgvt* fusionadas ao gene repórter *gox* de *A.niger*. Tais construções permitirão a caracterização funcional desses promotores no sistema heterólogo de *A. nidulans*, uma vez que um protocolo eficiente de transformação genética para o próprio *Hgvt* não está disponível.

Foram localizados sítios consenso de ligação aos fatores transcricionais CreA e PacC nas regiões promotoras dos genes de endoglicanase *egl1* e *egl4*. Por meio de ensaios de EMSA, pode-se observar interações específicas para PacC e para CreA na região 5' UP de *egl1*, indicando que esse gene é regulado pelo pH ambiental e por repressão por glicose.

Quando analisado o promotor de *egl4*, entretanto, PacC não foi capaz de reconhecer e interagir com o único sítio presente na região analisada, enquanto os sítios de reconhecimento para CreA levaram apenas a formação de complexos inespecífico. Esses dados sugerem mecanismos regulatórios distintos para esses dois genes de endoglicanase.

A etapa seguinte desse estudo consistirá na transformação genética de *A. nidulans* com as construções gene repórter obtidas: pGOX::*egl1*, pGOX::*egl4* e pGOX::*cbh1*. Após a análise genética dos recombinantes quanto à estabilidade mitótica, estes serão analisados quanto a atividade de glicose oxidase em crescimento em meios de cultura contendo fontes distintas de carbono e diferentes valores de pH. Esperamos com esses dados atingir uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios dos genes do complexo celulolítico de *H. grisea*.

**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, S. M. 2006. Análise estrutural e de expressão do gene *pacC* de *Paracoccidioides brasiliensis*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- Araujo, E. F.; Barros, E. G.; Caldas, R. A.; Silva, D. O. (1983). Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 11, p. 781-784.
- Aro, N.; Pakula, T.; Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 4, p. 719-39.
- Arst, H. N.; Penalva, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends Genet**, v. 19, n. 4, p. 224-31.
- Azevedo Mde, O.; Felipe, M. S.; Astolfi-Filho, S.; Radford, A. (1990). Cloning, sequencing and homologies of the *cbh-1* (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **J Gen Microbiol**, v. 136, n. 12, p. 2569-76.
- Barbosa, C. J. L. a. S. (2002). Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 330-340.
- Benoiel, B.; Pocas-Fonseca, M. J.; Torres, F. A.; De Moraes, L. M. (2010). Expression of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, n. 7, p. 2036-44.
- Bu, L.; Nimlos, M. R.; Shirts, M. R.; Stahlberg, J.; Himmel, M. E.; Crowley, M. F.; Beckham, G. T. (2012). Product binding varies dramatically between processive and nonprocessive cellulase enzymes. **J Biol Chem**, v. 287, n. 29, p. 24807-13.
- Caddick, M. X.; Brownlee, A. G.; Arst, H. N., Jr. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Mol Gen Genet**, v. 203, n. 2, p. 346-53.
- Calcagno-Pizarelli, A. M.; Negrete-Urtasun, S.; Denison, S. H.; Rudnicka, J. D.;

- Bussink, H. J.; Munera-Huertas, T.; Stanton, L.; Hervás-Aguilar, A.; Espeso, E. A.; Tilburn, J.; Arst, H. N., Jr.; Penalva, M. A. (2007). Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 12, p. 2365-75.
- Campos, L.; Felix, C. R. (1995). Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 6, p. 2436-8.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res** 37:D233-238.
- Coradetti, S. T.; Craig, J. P.; Xiong, Y.; Shock, T.; Tian, C.; Glass, N. L. (2012). Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 19, p. 7397-402.
- Costa, T. A. 2011. Regulação da expressão do gene de Glicana sintase 1 (PbFKS1) pelo fator transcricional PacC em *Paracoccidioides brasiliensis* (Dissertação de Mestrado). Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.
- Cubero, B.; Scazzocchio, C. (1994). Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **EMBO J**, v. 13, n. 2, p. 407-15.
- Cui, C.; Wani, M. A.; Wight, D.; Kopchick, J.; Stambrook, P. J. (1994). Reporter genes in transgenic mice. **Transgenic Res**, v. 3, n. 3, p. 182-94.
- Da Silva, R.; Yim, D. K.; Park, Y. K. (1994). Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 1, p. 109-111.
- Dantas-Barbosa, C.; Araujo, E. F.; Moraes, L. M.; Vainstein, M. H.; Azevedo, M. O. (1998). Genetic transformation of germinated conidia of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* to hygromycin B resistance. **FEMS Microbiol Lett**, v. 169, n. 1, p. 185-90.

- Davis, D. (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. **Curr Genet**, v. 44, n. 1, p. 1-7.
- De Faria, F. P.; Te, O. V.; Bergquist, P. L.; Azevedo, M. O.; Nevalainen, K. M. (2002). Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. **Lett Appl Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 119-23.
- De-Paula, E. H.; Ramos, L. P.; De Oliveira Azevedo, M. (1999). The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 1, p. 35-41.
- Dey, B.; Thukral, S.; Krishnan, S.; Chakrobarty, M.; Gupta, S.; Manghani, C.; Rani, V. (2012). DNA-protein interactions: methods for detection and analysis. **Mol Cell Biochem**, v. 365, n. 1-2, p. 279-99.
- Diez, E.; Alvaro, J.; Espeso, E. A.; Rainbow, L.; Suarez, T.; Tilburn, J.; Arst, H. N., Jr.; Penalva, M. A. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. **EMBO J**, v. 21, n. 6, p. 1350-9.
- Dohmoto, M.; Inoue, Y.; Kobayashi, A.; Ohashi, S.; Sano, M. (2010). Characterization of the *palH* gene from *Aspergillus oryzae*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 74, n. 1, p. 188-90.
- Dowzer, C. E.; Kelly, J. M. (1989). Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. **Curr Genet**, v. 15, n. 6, p. 457-9.
- \_\_\_\_\_. (1991). Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. 5701-9.
- Espeso, E. A.; Tilburn, J.; Sanchez-Pulido, L.; Brown, C. V.; Valencia, A.; Arst, H. N., Jr.; Penalva, M. A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. **J Mol Biol**, v. 274, n. 4, p. 466-80.
- Ferreira Filho, E. X. (1996). Purification and characterization of a beta-glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Can J Microbiol**, v. 42,

n. 1, p. 1-5.

Fungaro, M. H.; Rech, E.; Muhlen, G. S.; Vainstein, M. H.; Pascon, R. C.; De Queiroz, M. V.; Pizzirani-Kleiner, A. A.; De Azevedo, J. L. (1995). Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiol Lett**, v. 125, n. 2-3, p. 293-7.

Ghim, C. M.; Lee, S. K.; Takayama, S.; Mitchell, R. J. (2010). The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. **BMB Rep**, v. 43, n. 7, p. 451-60.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**, v. 280 ( Pt 2), p. 309-16.

Iikura, H.; Takashima, S.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Uozumi, T. (1997). Cloning of a gene encoding a putative xylanase with a cellulose-binding domain from *Humicola grisea*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 61, n. 9, p. 1593-5.

Ilmen, M.; Thrane, C.; Penttila, M. (1996). The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Mol Gen Genet**, v. 251, n. 4, p. 451-60.

Kuhad, R. C.; Gupta, R.; Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 280696.

Kulmburg, P.; Mathieu, M.; Dowzer, C.; Kelly, J.; Felenbok, B. (1993). Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 847-57.

Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 5, p. 377-91.

Kumar, S.; Ramón, D. (1996). Purification and regulation of the synthesis of a  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2-3, p. 287-293.

Lavoine, N.; Desloges, I.; Dufresne, A.; Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose - its

barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. **Carbohydr Polym**, v. 90, n. 2, p. 735-64.

Leskovac, V.; Trivic, S.; Wohlfahrt, G.; Kandrak, J.; Pericin, D. (2005).Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 4, p. 731-50.

Li, D. C.; Li, A. N.; Papageorgiou, A. C. (2011).Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 308730.

Lin, C. J.; Barbosa, A. S. (2002).Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 330-340.

Luque, R.; Orejas, M.; Perotti, N. I.; Ramon, D.; Lucca, M. E. (2004).pH control of the production of recombinant glucose oxidase in *Aspergillus nidulans*. **J Appl Microbiol**, v. 97, n. 2, p. 332-7.

Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. (2002).Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 506-77, table of contents.

Maccabe, A. P.; Orejas, M.; Perez-Gonzalez, J. A.; Ramon, D. (1998).Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. **J Bacteriol**, v. 180, n. 5, p. 1331-3.

Mach, R. L.; Strauss, J.; Zeilinger, S.; Schindler, M.; Kubicek, C. P. (1996).Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 1273-1281.

Mach, R. L.; Peterbauer, C. K.; Payer, K.; Jaksits, S.; Woo, S. L.; Zeilinger, S.; Kullnig, C. M.; Lorito, M.; Kubicek, C. P. (1999).Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 5, p. 1858-63.

Mach, R. L.; Zeilinger, S. (2003).Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 515-22.

- Mandalari, G.; Bisignano, G.; Lo Curto, R. B.; Waldron, K. W.; Faulds, C. B. (2008). Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 11, p. 5130-3.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **J Bacteriol**, v. 79, p. 816-26.
- Margolles-Clark, E.; Ilmen, M.; Penttila, M. (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 167-179.
- Martinez-Rossi, N. M.; Persinoti, G. F.; Peres, N. T.; Rossi, A. (2012). Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. **Mycoses**, v. 55, n. 5, p. 381-7.
- Medie, F.; Davies, G. J.; Drancourt, M.; Henrissat, B. (2012). Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 227-34.
- Mello-De-Sousa, T. M.; Silva-Pereira, I.; Pocas-Fonseca, M. J. (2011). Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **Enzyme Microb Technol**, v. 48, n. 1, p. 19-26.
- Mingot, J. M.; Espeso, E. A.; Diez, E.; Penalva, M. A. (2001). Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 5, p. 1688-99.
- Moraes, D. S. 2009. Análise da região promotora dos genes 1,3- $\beta$ -glicana sintase e quitina sintase 4 de *Paracoccidioides brasiliensis*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- Nascimento, C. V.; Souza, F. H.; Masui, D. C.; Leone, F. A.; Peralta, R. M.; Jorge, J. A.; Furriel, R. P. (2010). Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated beta-D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **J Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 53-62.
- Naylor, L. H. (1999). Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochem**

**Pharmacol**, v. 58, n. 5, p. 749-57.

O'meara, T. R.; Norton, D.; Price, M. S.; Hay, C.; Clements, M. F.; Nichols, C. B.; Alspaugh, J. A. (2010).Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 2, p. e1000776.

Pauly, M.; Keegstra, K. (2008).Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 559-568.

Penalva, M. A.; Arst, H. N., Jr. (2004).Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. **Annu Rev Microbiol**, v. 58, p. 425-51.

Penalva, M. A.; Tilburn, J.; Bignell, E.; Arst, H. N., Jr. (2008).Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 291-300.

Penttila, P. A.; Varnai, A.; Pere, J.; Tammelin, T.; Salmen, L.; Siika-Aho, M.; Viikari, L.; Serimaa, R. (2013).Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. **Bioresour Technol**, v. 129, p. 135-41.

Pestana-Calsa, M. C.; Pacheco, C. M.; De Castro, R. C.; De Almeida, R. R.; De Lira, N. P.; Junior, T. C. (2012).Cell wall, lignin and fatty acid-related transcriptome in soybean: Achieving gene expression patterns for bioenergy legume. **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 1 (suppl), p. 322-30.

Pingali, S. V.; Urban, V. S.; Heller, W. T.; Mcgaughey, J.; O'Neill, H.; Foston, M.; Myles, D. A.; Ragauskas, A.; Evans, B. R. (2010).Breakdown of cell wall nanostructure in dilute acid pretreated biomass. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 9, p. 2329-35.

Poças-Fonseca, M. J.; Lima, B. D.; Brigido, M. M.; Silva-Pereira, I.; Felipe, M. S.; Radford, A.; Azevedo, M. O. (1997).*Humicola grisea* var. *thermoidea* cbh1.2: A new gene in the family of cellobiohydrolases is expressed and encodes a cellulose-binding domain-less enzyme. **J Gen Appl Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 115-120.

Poças-Fonseca, M. J., Mello-de-Sousa, T. M. & Aguiar, S. M. (2008). pH-Related

transcriptional regulation of lignocellulolytic enzymes and virulence factors genes in fungi. In: **Current Advances in Molecular Mycology**. Y. Gherbawy, R. L. Mach & M. Rai (Eds.). Nova Science Publishers, Inc.

Poças-Fonseca, M. J.; Silva-Pereira, I.; Rocha, B. B.; Azevedo, M. D. O. (2000). Substrate-dependent differential expression of *Hemicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. **Can J Microbiol**, v. 46, n. 8, p. 749-52.

Portnoy, T.; Margeot, A.; Linke, R.; Atanasova, L.; Fekete, E.; Sandor, E.; Hartl, L.; Karaffa, L.; Druzhinina, I. S.; Seiboth, B.; Le Crom, S.; Kubicek, C. P. (2011). The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. **BMC Genomics**, v. 12, p. 269.

Pu, Y.; Kosa, M.; Kalluri, U. C.; Tuskan, G. A.; Ragauskas, A. J. (2011). Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91, n. 6, p. 1525-36.

Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemans, M. A.; Pouwels, P. H.; Van Den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene**, v. 56, n. 1, p. 117-24.

Ragauskas, A. J.; Williams, C. K.; Davison, B. H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C. A.; Frederick, W. J., Jr.; Hallett, J. P.; Leak, D. J.; Liotta, C. L.; Mielenz, J. R.; Murphy, R.; Templer, R.; Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-9.

Rahman, Z.; Shida, Y.; Furukawa, T.; Suzuki, Y.; Okada, H.; Ogasawara, W.; Morikawa, Y. (2009). Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular beta-glucosidase I. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 5, p. 1083-9.

Rauscher, R.; Wurleitner, E.; Wacenovský, C.; Aro, N.; Stricker, A. R.; Zeilinger, S.; Kubicek, C. P.; Penttilä, M.; Mach, R. L. (2006). Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 3, p. 447-56.

Rollins, J. A.; Dickman, M. B. (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*:



- identification of a *pacC*/*RIM1* homolog. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 1, p. 75-81.
- Ruijter, G. J.; Visser, J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 151, n. 2, p. 103-14.
- Sambrook, J., Russel D. W. (2001). **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. : : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandgren, M.; Gualfetti, P. J.; Paech, C.; Paech, S.; Shaw, A.; Gross, L. S.; Saldajeno, M.; Berglund, G. I.; Jones, T. A.; Mitchinson, C. (2003). The Humicola grisea Cell12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability. **Protein Sci**, v. 12, n. 12, p. 2782-93.
- Scheller, H. V.; Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. **Annu Rev Plant Biol**, v. 61, p. 263-89.
- 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**, v. 84, n. 6, p. 1150-64
- Selvig, K.; Alspaugh, J. A. (2011). pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 249-56.
- Shida, Y.; Furukawa, T.; Ogasawara, W.; Kato, M.; Kobayashi, T.; Okada, H.; Morikawa, Y. (2008). Functional analysis of the *egl3* upstream region in filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 78, n. 3, p. 515-24.
- Souza, W. R.; De Gouvea, P. F.; Savoldi, M.; Malavazi, I.; De Souza Bernardes, L. A.; Goldman, M. H.; De Vries, R. P.; De Castro Oliveira, J. V.; Goldman, G. H. (2011). Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, p. 40.
- Steyaert, J. M.; Weld, R. J.; Stewart, A. (2010). Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. **Fungal Biol**, v. 114, n. 2-3, p. 198-208.

- Strauss, J.; Horvath, H. K.; Abdallah, B. M.; Kindermann, J.; Mach, R. L.; Kubicek, C. P. (1999).The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 169-78.
- Su, S. S.; Mitchell, A. P. (1993).Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. **Genetics**, v. 133, n. 1, p. 67-77.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002).Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour Technol**, v. 83, n. 1, p. 1-11.
- \_\_\_\_\_. (2002).Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour Technol**, v. 83, n. 1, p. 1-11.
- Takashima, S.; Iikura, H.; Nakamura, A.; Hidaka, M.; Masaki, H.; Uozumi, T. (1999).Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. **J Biotechnol**, v. 67, n. 2-3, p. 85-97.
- Takashima, S.; Nakamura, A.; Hidaka, M.; Masaki, H.; Uozumi, T. (1996).Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **J Biotechnol**, v. 50, n. 2-3, p. 137-47.
- \_\_\_\_\_. (1998).Isolation of the creA gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of CreA binding sites upstream from the cellulase genes. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 62, n. 12, p. 2364-70.
- \_\_\_\_\_. (1999).Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. **J Biochem**, v. 125, n. 4, p. 728-36.
- Takashima, S.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Uozumi, T. (1997).Cloning, sequencing, and expression of a thermostable cellulase gene of *Humicola grisea*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 61, n. 2, p. 245-50.
- Takashima, S.; Ohno, M.; Hidaka, M.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Uozumi, T. (2007).Correlation between cellulose binding and activity of cellulose-binding domain mutants of *Humicola grisea* cellobiohydrolase 1. **FEBS Lett**, v. 581, n. 30, p. 5891-6.

- Tamayo, E. N.; Villanueva, A.; Hasper, A. A.; De Graaff, L. H.; Ramon, D.; Orejas, M. (2008). CreA mediates repression of the regulatory gene xlnR which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 6, p. 984-93.
- Tani, S.; Kanamasa, S.; Sumitani, J.; Arai, M.; Kawaguchi, T. (2012). XlnR-independent signaling pathway regulates both cellulase and xylanase genes in response to cellobiose in *Aspergillus aculeatus*. **Curr Genet**, v. 58, n. 2, p. 93-104.
- Tilburn, J.; Scazzocchio, C.; Taylor, G. G.; Zabicky-Zissman, J. H.; Lockington, R. A.; Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, n. 2-3, p. 205-21.
- Tilburn, J.; Sarkar, S.; Widdick, D. A.; Espeso, E. A.; Orejas, M.; Mungroo, J.; Penalva, M. A.; Arst, H. N., Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO J**, v. 14, n. 4, p. 779-90.
- Trevisan, G. L.; Oliveira, E. H.; Peres, N. T.; Cruz, A. H.; Martinez-Rossi, N. M.; Rossi, A. (2011). Transcription of *Aspergillus nidulans* pacC is modulated by alternative RNA splicing of palB. **FEBS Lett**, v. 585, n. 21, p. 3442-5.
- Wang, Q.; Szanislo, P. J. (2009). Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 9, p. 657-66.
- Westbrook, C. K. (2013). Biofuels Combustion. **Annu Rev Phys Chem**.
- White, W. L.; Downing, M. H. (1953). *Humicola grisea*, a Soil-Inhabiting, Cellulolytic Hyphomycete. **Mycologia**, v. 45, n. 6, p. 951-963.
- Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, n. 3, p. 295-9.
- Wong, C. M.; Wong, K. H.; Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 78, n. 6, p. 927-38.
- Wood, K. V. (1995). Marker proteins for gene expression. **Curr Opin Biotechnol**, v. 6, n. 1, p. 50-8.

- Wurleitner, E.; Pera, L.; Wacenovsky, C.; Cziferszky, A.; Zeilinger, S.; Kubicek, C. P.; Mach, R. L. (2003). Transcriptional regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 1, p. 150-8.
- Zeilinger, S.; Mach, R. L.; Kubicek, C. P. (1998). Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. **J Biol Chem**, v. 273, n. 51, p. 34463-71.
- Zhang, J.; Zhang, Y.; Zhong, Y.; Qu, Y.; Wang, T. (2012). Ras GTPases modulate morphogenesis, sporulation and cellulase gene expression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48786.
- Zhang, J.; Zhong, Y.; Zhao, X.; Wang, T. (2010). Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced beta-glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 24, p. 9815-8.
- Zimmermann, A. L.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A. (1990). Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1036, n. 1, p. 41-6.
- 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**, v. 11, p. 21.